

**MESSUNGEN
EINER SPEZIFISCHEN INSULINASEAKTIVITÄT
IN ERYTHROZYTEN
VON NORMALPERSONEN UND DIABETIKERN**

HERBERT SCHNEIDER

—
1982
—

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 2014774

AUS DEM KLINISCH-CHEMISCHEN INSTITUT
DES STÄDT. KRANKENHAUSES MÜNCHEN-HARLACHING

Direktor: Priv.-Doz. Dr. L. WEISS

MESSUNGEN EINER SPEZIFISCHEN INSULINASEAKTIVITÄT
IN ERYTHROZYTEN VON NORMALPERSONEN UND DIABETIKERN

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
HERBERT SCHNEIDER
aus München

1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. L. WEISS
Mitberichterstatter: Professor Dr. C. FRITZ
Dekan: Professor Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 25.5.1982



meinen Eltern
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>THEORETISCHE EINFÜHRUNG</u>	3
2.1. <u>Stoffwechsel des Insulins</u>	3
2.1.1. Insulinsekretion	3
2.1.2. Biochemische Wirkungen des Insulins	3
2.1.3. Regulation des Insulinspiegels	5
2.1.4. Pathobiochemie des Insulinstoffwechsels	6
2.2. <u>Inaktivierung des Insulins</u>	9
2.2.1. Abbauwege des Insulins	9
2.2.2. Abbau durch eine spezifische Insulinase	11
2.2.3. Genauere Charakterisierung der spezifischen Insulinase	13
3. <u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	15
3.1. <u>Versuchsaufbau zur Messung der Aktivität der insulinspezifischen Proteinase in Erythrozyten</u>	15
3.1.1. Einleitung	15
3.1.2. Testbeschreibung	15
3.1.3. Übersicht über den Ablauf des Standardprobeversuchs	17
3.1.4. Isotopenzähler	18
3.1.5. Präzision des Inaktivierungstestes	19

	Seite
3.2. <u>Einfluß verschiedener Faktoren auf den Aktivitätstest zur Messung der Insulinase</u>	21
3.2.1. Gewinnung der Blutproben	21
3.2.2. Einfluß der Lagerungszeit	23
3.2.3. pH Abhängigkeit der Insulinaseaktivität	24
3.2.4. Temperaturabhängigkeit	25
3.2.5. Abhängigkeit von der Insulinkonzentration	27
3.2.6. Sulfhydryl-Gruppen-Abhängigkeit der spezifischen Insulinase	30
3.3. <u>Testaufbau zur Messung der Insulinaseaktivität von Patientenkollektiven</u>	35
3.3.1. Erythrozytenhämolsat	35
3.3.2. Testansatz	35
3.3.3. Testdurchführung	36
3.3.4. Hämoglobintestung	38
3.4. <u>Untersuchungen am Normalkollektiv und an Diabetikern</u>	38
3.4.1. Übersicht über das Patientenkollektiv	38
3.4.2. Überblick über die Diabetiker-Gruppe	40
3.5. <u>Auswertung der Ergebnisse</u>	41
3.5.1. Protokollführung	41
3.5.2. Untersuchung über die Altersabhängigkeit der spezifischen Insulinase	42
3.5.3. Vergleichende Untersuchung zwischen Normal- und Diabetikerkollektiv	43

	Seite
3.5.4. Statistische Berechnung der Ergebnisse	45
3.5.5. Untersuchungen am Diabetikerkollektiv	48
4. <u>DISKUSSION</u>	51
5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	53
6. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	54

1. EINLEITUNG

Der Diabetes mellitus ist heute eine der häufigsten Krankheiten in der inneren Medizin. Man schätzt, daß allein in der Bundesrepublik Deutschland vier Prozent der Bevölkerung manifest an Diabetes erkrankt sind (21,43), nicht mitgerechnet diejenigen Fälle eines manifesten Diabetes, die jedoch bereits eine pathologische Kohlenhydrattoleranz zeigen. In den letzten hundert Jahren wurden schrittweise biologische Grundlagen, Ursachen, (Früh-) Diagnostik und immer weiter verbesserte Behandlungsmethoden dieser Stoffwechselkrankheit erforscht. Gemäß den Forschungsergebnissen steht heute das Insulin, seine Sekretion und seine Stoffwechselwirkungen im Mittelpunkt einer Betrachtung über den Diabetes mellitus. Zu Beginn der sechziger Jahre wurde die Aminosäuresequenz des Insulins (Primärstruktur) aufgeklärt (37). Damit waren die Grundlagen gelegt für Überlegungen über die Inaktivierung und den Abbau des Insulins. Es wurden Abbauaktivitäten in den verschiedenen Körpergeweben nachgewiesen (2,5,9,25). Naturgemäß war es aber schwierig am Menschen selbst Versuche vorzunehmen und deshalb liegen die meisten Ergebnisse über Insulininaktivierung in Studien über tierisches Gewebe vor. Das einzige menschliche Gewebe, das problemlos gewonnen werden kann, ist das Blut. Unter den Blutbestandteilen sind es wiederum die Erythrozyten, die Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen über die Inaktivierung von Insulin waren.

Die Arbeit basiert auf den Ergebnissen von Untersuchungen von Kolb et al. (27) und Tschesche et al. (46), die eine insulinspezifische Proteinase in menschlichen Erythrozyten beschrieben. Sie erläutern auch eine Methode zur Messung der Proteinaseaktivität. Darauf aufbauend sollte dieser Test weiterentwickelt und die Enzymaktivität an einem größeren Patientenkollektiv bestimmt werden. Grundfragestellung zu Beginn der Arbeit war eine Altersabhängigkeit der Enzymaktivität, später im Laufe der Arbeit

wurde dann auch die Frage nach dem Verhalten bei diabetischer Stoffwechsellaage miteinbezogen. Details des Aktivitätstestes bzw. die genauen Versuchsbedingungen wurden erst nach Auswertung einer Versuchsreihe festgelegt, bei der verschiedene Bedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Insulinkonzentration etc. variiert wurden. Es stellte sich auch das Problem der Probenentnahme; geeignete Patienten mußten ausgewählt, die Blutentnahme durchgeführt und an Hand der Krankengeschichte die Eignung des Patienten für den Test überprüft werden. Das Ziel war, den Versuchsablauf so zu gestalten und die einzelnen Schritte miteinander so zu koordinieren, daß die Bestimmung von mehreren Proben an einem Tag möglich wurde.

Das Ziel dieser Arbeit liegt darin, die enzymatische Insulinabbauaktivität in Erythrozyten von Normalpersonen und Diabetikern zu bestimmen, um Hinweise auf die pathobiochemische Bedeutung dieser Enzymaktivität zu erhalten.

2. THEORETISCHE EINFÜHRUNG

2.1. Stoffwechsel des Insulins

2.1.1. Insulinsekretion (12,20,42)

Beim Insulin handelt es sich um ein Peptidhormon, das in den B-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas synthetisiert wird. Die Aminosäuresequenz des Insulins variiert bei den einzelnen Säugetierspezies, trotzdem sind auch diese Insuline beim Menschen wirksam. Die Synthese erfolgt als sog. Proinsulin im Ergastoplasma der Langerhans'schen Zellen. Das Proinsulin liegt als einkettiger Polypeptidstrang vor, im weiteren Verlauf wird dann ein Mittelteil (C-Peptid) abgespalten und somit das im Organismus wirksame Insulin hergestellt. Die Freisetzung geschieht durch einen Exocytosemechanismus (28). Das menschliche Insulin besteht aus insgesamt 51 Aminosäuren, die in zwei Polypeptidketten (A- und B-Kette) vorliegen. Diese beiden Ketten mit jeweils 21 bzw. 30 Aminosäuren sind durch zwei Disulfidbrücken verbunden. Die Abspaltung des C-Peptids ist entscheidend für die Wirkung des Insulins, da weder Proinsulin noch die einzelnen Kettenfragmente biologisch wirksam sind.

2.1.2. Biochemische Wirkungen des Insulins (20,31,36,42)

Insulin wirkt nicht gleich stark auf alle Zellen des Organismus. Als insulinempfindlich gelten vor allem das Muskelgewebe, das Fettgewebe, die Leber und einige andere stoffwechselaktive Gewebe. Relativ insulinunempfindlich sind hingegen die intestinale Mucosa und wichtig im Hinblick auf diese Arbeit die Erythrozyten. Die Wirkungen des Insulins betreffen den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel. Durch den Insulinspiegel wird die Durchlässigkeit der Membranen der Zellen für Glucose reguliert. Diese Membranen weisen Poren von ca. 3 bis 5 Å auf. Durch sol-

che Poren können nur sehr kleine Moleküle permeieren, wie z.B. Wasser und Glycerin. Größere Moleküle, wie etwa Glucose, können diese Membranen kaum noch passieren: Es ist ein Carrier-Mechanismus erforderlich, um diese Barriere zu überwinden. Insulin verändert bestimmte Eigenschaften des in der Membran lokalisierten Glucosetransportsystems (29). Wenn hierbei, wie vermutet wird, das Prinzip des sog. second messengers (13,14) zur Anwendung kommt, muß das Hormon selbst nicht in die Zelle gelangen. Insulin reagiert mit einem spezifischen Rezeptor an der Zellmembran (8,14). Solch spezifische Insulinrezeptoren wurden sowohl in der Zellmembran von Leber und Fettgewebe, als auch in Erythrozyten nachgewiesen (15). Insulin fördert nicht nur den Glucosedurchsatz, sondern stimuliert auch die Glucoseverwertung der Zelle, sei es über den Glykolyseweg oder auch z.B. in der Leberzelle durch Stimulierung der Glykogensynthese. Insulin regelt die zur Glucoseverwertung wichtigen Enzyme Pyruvatkinase, Phosphofructokinase, Glukokinase und Glykogensynthetase und hemmt die Gluconeogenese durch Einfluß auf die antagonistisch wirkenden Enzyme, wobei eine Regulation im Bereich der Ribosomen diskutiert wird (50).

Im Fettstoffwechsel nimmt Insulin eine zentrale Stellung ein. Neben einer antilipolytischen Wirkung und der Beschleunigung der Glucoseaufnahme und Stimulierung des Glucoseabbaus wird das zur Triglyceridbiosynthese benötigte α -Glycerophosphat bereitgestellt. Durch Ankurbelung des Pentosephosphatwegs werden durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat die notwendigen Reduktionsäquivalente, über mitochondriales und nach Translokation cytosolisches Acetyl-CoA der für die Fettsäurebiosynthese erforderliche Kohlenstoff gewonnen. Endeffekt der antilipolytischen, lipogenetischen und glycerogenen Wirkung ist die erhöhte Fettspeicherung in der Zelle. Auf der Ebene des Aminosäure- und Proteinstoffwechsels zeigt Insulin folgende Wirkungen: Es fördert den Transport und den Einbau von Aminosäuren in Proteine. Größere Bedeutung

hat diese Wirkung des Insulins allerdings nur im Muskel- und Lebergewebe. Die Leber als Erfolgsorgan des Insulins weist einige Besonderheiten auf. Hauptsächlich dominiert der Regulationsmechanismus der Glykolyse und Gluconeogenese wie oben erwähnt. Grob gesehen wird durch Insulin der Leberstoffwechsel von Glukoneogenese auf Glucoseabbau und Glykogensynthese umgeschaltet. Nach Insulinapplikation wird dem Pfortaderblut Glucose entzogen, während bei Insulinmangel Glucose an die Blutbahn abgegeben wird. Zusätzlich zu den oben erwähnten Schlüsselenzymen für Glykolyse und Gluconeogenese, die durch den Insulinspiegel modifiziert werden, wurde in der Leber eine insulininduzierbare Glukokinase nachgewiesen (12,42). Die Hexokinase der extrahepatischen Gewebe hat eine sehr niedrige Michaeliskonstante für Glucose, sodaß der limitierende Faktor die durch das Insulin regulierte Permeabilität der Zellmembran ist. Die nur in der Leber vorhandene Glukokinase hingegen zeigt keine so hohe Affinität zur Glucose und ist somit bei freier Permeabilität der Zellmembran in der Leber für Glucose hauptsächlich für die Verarbeitung von evtl. auftretenden Blutzuckerspitzen verantwortlich. Zusammenfassend läßt sich sagen: Insulin ist ein anaboles Hormon, das bei Nahrungszufuhr die Aufnahme der Nährstoffe in die einzelnen Depots reguliert, die Speicherung von Glukose als Glykogen in der Leber, von Fettsäuren als Triglyceriden im Fettgewebe und von Aminosäuren als Proteinen im Muskelgewebe.

2.1.3. Regulation des Insulinspiegels (7,12,41,42)

Nach den neueren Forschungsergebnissen darf man nicht nur den Glucosespiegel im Blut für die Regulation des Insulinspiegels bzw. der Sekretion aus den B-Zellen des Pankreas verantwortlich machen. Selbst die Glucose hat verschieden starke Sekretionsreize, je nachdem, ob sie oral oder parenteral gegeben wird. Auch kennt man neben Glucose und Glucosemetaboliten andere in der Nahrung vorhandene Substrate, die in die Insulinsekretionsregelung eingrei-

fen. Seit längerer Zeit sind Aminosäuren bekannt, die stimulierend auf die Insulinausschüttung einwirken (11). Eine Veränderung des Kaliumspiegels (22) als Wirkung auf die Insulinsekretion, aber auch als Ursache für die Sekretion wird diskutiert. Aminosäuren können nur im Zusammenwirken mit Glucose (10) eine Insulinausschüttung in den B-Zellen induzieren. Das gleiche gilt für orale Antidiabetika, die Sulfonylharnstoffe. Die Arbeitsgruppe um Grodsky (19) untersuchte die Einwirkungszeit von verschiedenen Substraten auf die Insulinsekretion. Renold (41) zeigt auf, daß nach elektronen-mikroskopischen Untersuchungen alles dafür spricht, daß das Insulin durch eine kontrollierte Emiocytose aus den B-Zellen ausgeschleust wird. Neben Glucose hält er auch die Regulation durch ein Adenylcyclase (cyclisches AMP)-System, durch autonome vegetative Nerveneinflüsse und verschiedene andere Substrate, u.a. auch Veränderungen des Calciumspiegels für möglich. Die Regulation des Insulinspiegels erscheint ziemlich komplex, wird doch nicht nur die Insulinsekretion durch mehrere Parameter beeinflusst, sondern auch die Bindungskapazität der insulinspezifischen Rezeptoren an der Zellmembran durch den augenblicklichen Ernährungszustand modifiziert (14).

2.1.4. Pathobiochemie des Insulinstoffwechsels (12,20,31,32,36,38, 42,49)

Ein erhöhter pathologischer Insulinspiegel findet sich nach medikamentöser Injektion oder bei einem Adenom der B-Zellen des Pankreas. Folge dieses Hyperinsulinismus, der auch vor dem Manifestwerden eines Diabetes mellitus oder bei Fettsüchtigen auftreten kann, ist eine Symptomatik, die von anfallsweisem Heißhunger bis zum hypoglykämischen Coma reichen kann.

Beim Diabetes mellitus liegt ein absoluter oder relativer Insulinmangel vor. Entsprechend den vorher aufgeführten Wirkungen des Insulins auf den Stoffwechsel, überwiegt bei einem Insulinman-

gel die Lipolyse mit Freisetzung von Glycerin und freien Fettsäuren. Ebenfalls wird die Proteolyse gesteigert, wobei auch die Harnstoffbiosynthese erhöht wird. Das erhöhte Angebot an freien Fettsäuren in der Leber führt dann zu einer überwiegenden Fettsäureoxidation und einer überschießenden Ketogenese. Durch Fehlen des Insulins wird die Gluconeogenese gesteigert und zugleich die Verwertung der vorhandenen Glucose gestört. Trotz eines Überangebotes an Glucose kann sie von der Zelle nicht aufgenommen werden. Hyperglykämie und Glucosurie sind die Folge. Glucose und Ketonkörper werden in den Urin ausgeschieden. Da die Konzentrationsfähigkeit des Harns begrenzt ist, kommt es zur Zwangspolyurie mit enormen Wasserverlusten. Durch diese Diurese erfolgt gleichzeitig ein Verlust an Elektrolyten mit großen Verschiebungen vor allem im Kalium- und Natriumstoffwechsel. Diese Elektrolytentgleisungen zusammen mit der diuretisch bedingten starken Exsikkose und der Anhäufung von Ketonkörpern im Blut mit Verschiebung des Blut-pH zum Säuren führen schließlich zum Zustand des Coma diabeticum.

Bei längerem Bestehen der diabetischen Stoffwechsellage kommt es zu folgenden typischen Organveränderungen: Einer generalisierten Arteriosklerose mit Angina pectoris und Durchblutungsstörungen der Extremitäten, einer Visusverschlechterung mit Netzhautveränderungen, einer Glomerulosklerose mit finaler Niereninsuffizienz, einer durch Gefäßveränderungen bedingten Neuropathie, zur Fettleber und Hyperlipoproteinämie, zu Übergewicht und erhöhter Infektanfälligkeit. Für den Insulinmangel kommen mehrere Ursachen in Betracht. Das Spektrum reicht von der Synthesestörung in den B-Zellen über Sekretionsstörungen bis zum Extremfall eines atypischen Insulins. In der Klinik kann man folgende Einteilung des Diabetes treffen, die auch für die spätere Interpretation der Versuchsergebnisse bei Diabetikern relevant sein dürfte (24,35,48):

1. Der insulinabhängige, zu Ketose neigende Diabetes, der mit einem mehr oder minder häufigen Vorkommen bestimmter Histo-kompatibilitätsantigene (HLA) auf dem sechsten Chromosom und von Inselzellantikörpern einhergeht, wird als eindeutige Untergruppe des Diabetes angesehen (Insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM),^{a)} Typ I).
2. Der nicht insulinabhängige, kaum zu Ketose neigende Diabetes, der nicht mit bestimmten Krankheiten oder Syndromen verknüpft ist, stellt eine weitere Untergruppe des Diabetes dar (Nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus (NIDDM),^{b)} Typ II). Diese Untergruppe wird wiederum unterteilt, je nachdem, ob sie mit oder ohne Adipositas auftritt. Es kann hierfür eine vielfältige Ätiologie verantwortlich sein. Häufiges familiäres Auftreten spricht für die Bedeutung genetischer Faktoren, und in diese Gruppe gehört der Diabetes bei Kindern und Erwachsenen, bei denen eine autosomale dominante Erbfolge eindeutig nachgewiesen ist. Bei genetischer Disposition spielen wahrscheinlich auch Umweltfaktoren bei der Manifestation der NIDDM-Typen eine Rolle. Möglicherweise ist auch Übergewicht ein ätiologischer Faktor.

Zur Therapie des Typ I Diabetes stehen je nach Anzahl der erforderlichen Insulineinheiten und der gewünschten Wirkungs-dauer Altinsuline, d.h. native Insuline mit kurzer Wirkungs-dauer und sog. Depotinsuline mit längerer Wirkungs-dauer zur Verfügung. Die Problematik der Insulintherapie umfaßt sowohl die Probleme bei der parenteralen Gabe des Insulins, wie ständig wechselnde Injektionsstellen, allergische Reaktionen und Bildung von Antikörpern, als auch das Problem der Dosierung. So soll mit möglichst wenig Injektionen ein möglichst gleichmäßiger Insulinspiegel erreicht werden. Ein gleichbleibender Insulinspiegel oder gar

a) IDDM insulin dependent D.m.

b) NIDDM non-insulin dependent D.m.

eine physiologische Insulinanpassung an den Blutglucosespiegel sind nur sehr schwer realisierbar. Andererseits führt ein stark schwankender Insulinspiegel zu all den pathologischen Veränderungen infolge eines Entgleisens des allgemeinen Stoffwechsels.

Für Patienten mit Diabetes vom Typ II reichen meist Therapiemaßnahmen, die Gewichtsreduktion, diätetische Maßnahmen und evtl. unterstützende Gabe von oralen Antidiabetika umfassen, zur Gewährleistung einer normalen Lebensführung aus.

2.2. Inaktivierung des Insulins

2.2.1. Abbauege des Insulins (12,36,42)

Die biologische Halbwertszeit des Insulins beim Menschen beträgt etwa zwanzig Minuten (36). Nach einschlägigen Forschungsergebnissen (46) finden sich zwei Wege des Insulinabbaus, die sich in ihrem Wirkungsmechanismus unterscheiden. Zum ersten eine enzymatische Reduktion der Disulfidbrücken durch die Glutathion-insulintranshydrogenase (2) und zum zweiten eine proteolytische Spaltung durch eine Proteinase, die zum Teil anscheinend insulin-spezifisch reagieren. Eine insulinabbauende Aktivität wurde in vielen Organen, wie Niere, Milz, Skelettmuskel, Fettgewebe, Pankreas, Placenta und Leber, gezeigt (2,5,9,25). Anfänglich konnte noch nicht zwischen den zwei oben erwähnten Abbaumöglichkeiten differenziert werden und es wurde einfach die Gesamtinaktivierungsrate in Organextrakten bestimmt. Erstmals beschreibt Brush (5) eine spezifische Proteinase für Insulin im Skelettmuskel der Ratte. Er vergleicht diese aus Rattenmuskel isolierte Proteinase in ihrer Wirksamkeit auf Proinsulin und Proinsulinintermediärprodukte gegenüber der Abbaurrate auf Insulin. Es wird eine hohe Spezifität gegenüber Insulin festgestellt. Das pH-Optimum für diese sog. Insulinase liegt bei pH 7,8. Das Ergebnis einer Arbeitsgruppe um Ansorge (1) über die insulinabbauende Aktivität der

Rattenleber mit Hilfe von ^{125}I oder ^{131}I markiertem Insulin war, daß hier eine Glutathioninsulintranshydrogenase vorliegt, die hauptsächlich in den Lysosomen, Mikrosomen, zum Teil auch in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dabei konnte eine Abhängigkeit dieser Insulintranshydrogenaseaktivität vom Glutathionspiegel gezeigt werden. Posner (39) untersuchte die insulinabbauende Aktivität von menschlichem Placentagewebe. Seine Forschungsarbeiten erbrachten, daß es in der menschlichen Placenta zwei verschiedene Abbauaktivitäten für Insulin gibt, eine Glutathioninsulintranshydrogenase und eine sulfhydrylgruppenabhängige Proteinase. Weiter ist noch zu erwähnen eine Arbeit von Duckworth (9) über die Anreicherung einer spezifischen Insulinproteinase aus dem Cytoplasma des Rattenskelettmuskels. In einer Reihe von chromatographischen Reinigungsverfahren wurde ein Enzym isoliert, das spezifisch Insulin, nicht aber Proinsulin inaktivierte. Diese Arbeit bestätigt die Ergebnisse von Brush und beschreibt ein von Sulfhydrylgruppen abhängiges Enzym mit einem physiologischen pH-Optimum. Das isolierte Enzym wird als sehr instabil beschrieben. Im nativen Blut konnte er die Aktivität nicht nachweisen. Ähnlich den Verhältnissen in der menschlichen Placenta stellten Tasaka und Campbell (44) die Anwesenheit einer spezifischen proteolytischen Insulinase im Pankreasgewebe fest. Eingehendere Untersuchungen über diese erstmals von Mirsky postulierte insulin-spezifische Proteinase liefern Baskin und Kitabchi (3). Sie untersuchten verschiedene Substrate der spezifischen Proteinase und fanden, daß durch hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen in den beiden Ketten des Insulins das Hormon biologisch unwirksam gemacht wird. Auch ist nach Aussage dieser Arbeit eine hohe Spezifität allein für Insulin vorhanden, da andere Proteine, wie Albumin oder partielle Bruchstücke des Insulins nicht oder nur in geringem Maße angegriffen werden.

2.2.2. Abbau durch eine spezifische Insulinase

Bei all diesen Untersuchungen handelt es sich um Studien über die vorhandene Inaktivierungskapazität einzelner Körpergewebe. Dabei blieb aber unberücksichtigt inwieweit Insulin physiologischerweise in diese Gewebe bzw. Zellkompartimente gelangen kann. Eine hohe spezifische Aktivität eines Enzymsystems für den Abbau sagt nichts aus, wenn das spezifische Substrat nicht in ausreichendem Maße vorhanden ist. So finden sich im Plasma nur verschwindend geringe Aktivitäten insulinaktivierender Enzymsysteme. Erst in neuerer Zeit lassen Forschungsergebnisse darauf schließen, daß Insulin nicht nur an Rezeptoren an der Zellmembran gebunden wird, sondern auch selbst in die Zellen einzudringen vermag. Terris und Steiner sowie Goldfine und Smith (6,16,17,45) beschreiben eine Aufnahme des Insulins in die einzelne Zelle. Eine spezifische Studie für Erythrozyten, nämlich die Aufnahme von ^{125}I markiertem Insulin in Erythrozyten, liegt von H.J. Kolb vor (Manuskript in Vorbereitung). Die meisten Systeme, die bisher beschrieben wurden, liegen intrazellulär.

Für das in die Zellen gelangte Insulin stehen zwei Systeme zur Inaktivierung zur Verfügung. Als erstes die schon erwähnte Glutathioninsulintranshydrogenase, die von Katzen als auch von Ansorge und Mitarbeitern beschrieben wurde und die Insulin wie auch andere Proteine durch Spaltung der Disulfidbrücken inaktiviert. Nach Ansorge (1) ist dieses Enzym in den Mikrosomen lokalisiert und zeigt in seiner Aktivität eine starke Abhängigkeit von dem in der Zelle vorhandenen Glutathionspiegel. Die Untersuchungen der Transhydrogenase (Ansorge et al. 2) wurden bei 100 bis 1000 fach höherer Konzentration durchgeführt. Das zweite von Brush (5) getestete Enzymsystem, das man dem Cytosolkompartiment zu-rechnet und als insulinspezifische Proteinase bezeichnet, wurde in allen Rattenorganen identifiziert und nachgewiesen, speziell gereinigt und gewonnen aus Muskel, Niere und Leber. Nach Arbei-

ten von Baskin und Kitabchi (3) wird dieses Enzym häufig angetroffen, wenn mehr als 90% des Insulins inaktiviert werden. Nach Meinung der Autoren besitzt die insulinspezifische Proteinase eine größere Rolle als die Glutathioninsulintranshydrogenase, da physiologische Insulinkonzentrationen inaktiviert werden. Von diesen Autoren werden auch nähere Einzelheiten eines Testes zur Bestimmung der Inaktivierungsrate der spezifischen Insulinproteinase beschrieben. Die Methode besteht darin, daß einer bestimmten Menge nativen Insulins¹²⁵I markiertes Insulin als "Marker" beigelegt wird und durch Messung der¹²⁵I-Radioaktivität im Überstand nach Fällung mit Trichloressigsäure die Enzyminaktivierungsrate ermittelt wird. Je nach Enzymmenge im Ansatz wird zu Beginn der Inkubation eine lineare Beziehung zwischen Enzymkonzentration und Insulininaktivierung festgestellt. Um eine auch von anderen Autoren beschriebene Stimulierung durch SH-Gruppen tragende Elemente abzublocken, arbeiten die beiden Autoren bei ihrem Test mit der Substanz Jodacetamid. Zur Wirkungsspezifität der Insulinase wird ein Vergleich zwischen Insulin, Proinsulin und selektiven A- und B-Ketten angeführt. Wird bei Proinsulin nur 8% der Wirkung, bezogen auf Insulin, erreicht, so werden sowohl die A- als auch die B-Ketten im isolierten Zustand von dieser Insulinproteinase nicht angegriffen. Damit wird die Spezifität dieser Insulinase, wie sie Brush für die Rattenmuskulatur beschrieben hat (5), bestätigt. Abbauende Enzymsysteme für Insulin im menschlichen Blut wurden durch Arbeiten von Mirsky (33), Berson (4) und Grodsky (18) nachgewiesen. Nach den Forschungsergebnissen von Kolb et al. (26) und Tschesche et al. (46) handelt es sich bei den insulininaktivierenden Enzymen mit größter Sicherheit um eine Proteinase, da durch Zugabe von Proteinaseinhibitoren die Enzymaktivität blockiert werden konnte. Auch wies die in roten Blutzellen nachgewiesene Insulinase homologe Eigenschaften auf, wie sie auch durch oben angeführte Untersuchungen in Niere, Milz, Muskeln, Fettgewebe, Pankreas, Placenta und Leber nachgewiesen wurden. Über die Lokalisation der Proteinase läßt sich

auf Grund der Untersuchungen aus (46) folgendes schließen:

Werden Plasma allein oder native Erythrozyten im Inkubationsansatz verwendet, findet man eine relativ geringe Inaktivierungsrate. Werden hingegen die Erythrozyten vor Inkubation hämolyisiert, steigt die Inaktivierungsrate beträchtlich. Daraus läßt sich folgern, daß es sich um ein lösliches Enzym im Cytoplasma-kompartiment der Erythrozyten handelt.

2.2.3. Genauere Charakterisierung der spezifischen Insulinase

Eine detailliertere Beschreibung des Enzyms liefern Kolb und Standl in ihrer neuesten Arbeit (25) über die Isolierung einer insulin-spezifischen Proteinase (Insulinase) aus menschlichen Erythrozyten. Dabei handelt es sich um eine Proteinase, welche Insulin in physiologischen Konzentrationen mit einer großen Spezifität abbaut. Das Molekulargewicht liegt zwischen 150 und 160 000 und das Enzym besteht aus vier Untereinheiten. Speziell die Untersuchungen über Proteinaseinhibitoren und Spaltprodukte bestätigen den Proteinasecharakter dieser Insulinase. Nochmals wird auf die starke stimulierende Wirkung von SH-Gruppen tragenden Substanzen hingewiesen, die besonders dadurch an Bedeutung gewinnt, wenn man die hohe Konzentration von reduziertem Glutathion in menschlichen Erythrozyten berücksichtigt. Bei einer Temperatur von 4° C ist die Stabilität der Insulinase gut, über 40° C wird das Enzym irreversibel denaturiert. Außerhalb eines pH-Bereiches von 5,5 bis 9,0 sinkt die biologische Aktivität steil ab. Nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen erleidet das Enzym ebenfalls einen starken Aktivitätsverlust. Um die Spaltprodukte der Insulinase zu charakterisieren und um einen Einblick in den Wirkungsmechanismus dieser Proteinase zu gewinnen, wurden die Spaltprodukte nach einem Versuchslauf chromatographisch mit Albumin, Insulin und der A-Kette des Insulins verglichen. Stoppt man die Reaktion kurz nach dem Start, so erhält man nur Albumin und natives Insulin in der chromatographischen Aufzeichnung. Nach ca. 15

Minuten werden mehrere Spaltprodukte im Bereich zwischen Insulin und A-Kette des Insulins beobachtet. Nach einer Stunde schließlich finden sich nur noch der Albuminpeak und ein Hauptpeak in einer Position kleiner als die A-Ketten von Insulin, sodaß man daraus schließen kann, daß das insulininaktivierende Enzym aus menschlichen Erythrozyten mit ziemlicher Sicherheit eine Proteinase ist. Um die Spezifität des gewonnenen und isolierten Enzyms zu überprüfen, untersuchen die Autoren seine Wirkung auf andere Proteohormone. Das mit ^{125}I markierte Insulin wird schnell und gleichmäßig inaktiviert, bei parallelen Versuchen mit menschlichem Wachstumshormon, Prolaktin und thyreotropem Hormon (TSH) hingegen findet sich keine Inaktivierung. Ebenso konnte keine Wirkung auf eine Reihe von Enzymen festgestellt werden, darunter Lactatdehydrogenase, Fructosebiphosphataldolase, Fructose-1,6-biphosphatase u.a.. Näher belegt wird die hohe Spezifität auch durch den Vergleich mit den Proteinasen Trypsin und Chymotrypsin. Selbst bei einer 50-fachen Überdosierung der beiden Proteinasen im Vergleich zur Insulinase finden sich sehr geringe Abbauraten von nativem Insulin unter den Testbedingungen. Dabei dürfte das im Ansatz immer vorhandene Albumin während der Inkubation eher eine Schutzfunktion für Insulin vor dem Angriff der Proteinasen Trypsin und Chymotrypsin bilden. Andererseits ergibt sich auch bei hohem Albumingehalt keinerlei signifikante Einschränkung der Wirksamkeit der spezifischen Insulinase. Als spezifische Aktivität finden die Autoren (25), daß 1 mg der gereinigten Insulinase fähig ist 50 pmol Insulin pro Minute zu inaktivieren. Diese spezifische Aktivität ist damit um das Hundertfache höher als das bisher angereicherte Enzym aus dem Skelettmuskel der Ratte. Rechnet man diese Kapazität auf alle roten Blutzellen hoch, so reicht dieses Potential theoretisch aus die tägliche Insulinausschüttung des Pankreas zu inaktivieren.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Versuchsaufbau zur Messung der Aktivität der insulin-spezifischen Proteinase in Erythrozyten

3.1.1. Einleitung

Ausgehend von einem von Kolb und Standl (46) beschriebenen Test zur Bestimmung der Enzymaktivität der spezifischen Insulinase war es Ziel dieser Arbeit Eigenschaften und Verhalten dieser Insulinase näher zu untersuchen. Zuerst wurden die Testbedingungen systematisch untersucht. Erst nach Festlegung aller Versuchsparameter und Ausarbeitung eines standardisierten Vorgehens wurden die Untersuchungen an verschiedenen Patientenkollektiven durchgeführt.

3.1.2. Testbeschreibung

Der Aktivitätstest wird in Anlehnung an Kolb und Standl (26,46) durchgeführt.

Das Blut wird mittels venöser Entnahme vom Patienten gewonnen und zur Hemmung der Blutgerinnung mit Heparin versetzt oder bei späteren Versuchen in mit EDTA beschichtete Röhrchen verbracht. Es schließt sich eine zehnminütige Zentrifugation mit ca. 3000 U/min bei Zimmertemperatur an. Sodann werden das überstehende Serum und die Zellrückstände abgesaugt. Nach dem Versetzen mit Isoton^R, gründlichem Durchmischen und einer erneuten Zentrifugation für 10 Minuten mit 3000 U/min wird der entstehende Überstand über der Erythrozytensuspension erneut abgesaugt. Bei zweimaliger Wiederholung dieses Vorgangs liegt schließlich ein Erythrozytenkonzentrat vor, in dem sich bei einer Kontrolle im Blutaussstrich höchstens ein Leukozyt im Gesichtsfeld findet. Mittels einer Eppendorfpipette werden 200 µl Konzentrat aufgezogen und in ein Reagenzglas abpipettiert, die Spitze von der Pipette

abgenommen und mit Hilfe einer Glaspipette mit 2 ml Aqua dest. die Eppendorfspitze nachgespült und durchgeblasen. Damit liegt im Reagenzglas nach dem Durchmischen auf einem Rüttler (30 sec.) und Eintritt der Hämolyse ein Hämolysat im Verhältnis von 1 : 11 vor. Für den Versuch benötigt man eine minimale Blutmenge von 1 - 2 ml, was insbesondere für Untersuchungen z.B. von Kleinkindern wichtig ist. Nach der Verarbeitung ermöglicht die entstehende Hämolysatmenge von etwas mehr als 2 ml die Durchführung von vier Testansätzen, d.h. eine reguläre Doppelbestimmung und deren evtl. Wiederholung. Eine kleine Menge Hämolysat bleibt zur Bestimmung des Hb-Gehaltes.

Als Grundlösung für den Testansatz dient ein Rinderalbuminpuffer. In einen 10 mM Tris-HCl Puffer, eingestellt auf einen End-pH von 7,4, wird kristallines Rinderalbumin in einer Konzentration von 1 mg/ml eingerührt und der endgültige pH des Puffers nochmals auf einen Wert von 7,4 korrigiert.

Die Insulinstammlösung wird durch Einwaage von kristallinem Rinderinsulin mit einer spezifischen Aktivität von 25 E/mg Protein in 0,001 N HCl hergestellt. Die entstehende Stammlösung mit einer Konzentration von 10 E/ml wird portioniert eingefroren, bei Bedarf aufgetaut und mit 0,001 N HCl soweit verdünnt, bis je nach gewünschtem Versuchsansatz eine Lösung entsteht, die in 0,2 ml 1 bis 0,1 mE Insulin enthält. Damit liegt die Insulinkonzentration im Versuchsansatz normalerweise bei 0,05 mE/ml oder 0,5 mE/ml.

Eine ^{125}I Insulinlösung, ein handelsübliches Präparat der Firma Novo Dänemark, wurde mit Albuminpuffer verdünnt, bis eine Aktivität von 100 000 c.p.m. in 0,2 ml (Referenz) erreicht wurde.

3.1.3. Übersicht über den Ablauf des Standardprobeversuchs

Grundlösung für den Inkubationsansatz sind 0,5 ml der Albumin-Pufferlösung. Dazu werden 0,2 ml Rinderinsulinlösung entsprechender Konzentration gegeben, sodaß z.B. im Standardprobeversuch 1 mE Insulin im Ansatz bzw. 0,1 mE im Testversuch für Patienten vorhanden sind. 0,2 ml der mit ^{125}I markierten Insulinlösung (ca. 100 000 c.p.m. Aktivität) werden als "Marker" beigelegt. Anschließend wird mit 0,9 ml Aqua dest. aufgefüllt. Durch Zugabe von 0,5 ml Hämolyatlösung wird die Reaktion gestartet und gleichzeitig das Inkubationsgesamtvolumen von 2 ml erreicht. Während des Testes wird das Mischen der Proben sowie die konstante Versuchstemperatur (meist 37°C) durch ein Schüttelwarmwasserbad gewährleistet. In festgelegten Zeitabständen wird ein Aliquot (500 μl) entnommen, mit demselben Volumen 5%iger TCA (Trichloroessigsäure) vermischt und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird ein Aliquot (500 μl) des Überstandes zur Zählung in einen γ -Counter gegeben.

Die Angabe der Inaktivierung in % erfolgt bezogen auf die Menge der vorgelegten Radioaktivität (Referenz 0,2 ml $\hat{=}$ 100 %) in Abhängigkeit der in TCA löslichen (und nicht präzipitierten) Aktivität.

Die ersten Testversuche zeigten bei einer hohen Insulinkonzentration im Testansatz keine ausreichende prozentuale Inaktivierung. Bis zur Herabsetzung auf 1 mE/ml Insulin im Ansatz zeigte der Test unbefriedigende Ergebnisse. Für die weiteren Versuche wurde meist eine Konzentration von 1 mE (0,5 mE/ml) im Ansatz von 2 ml verwendet, bei der sich eine Inaktivierungsrate, von 4% beginnend und nach 20 Minuten auf ca. 25% ansteigend, zeigte. Hiermit war ein Testansatz erstellt, der es ermöglichte weitere Modifikationen zu untersuchen.

3.1.4. Isotopenzähler

Für die radioaktiven Auszählungen kommt ein γ -Counter der Firma Nuclear Enterprises zur Anwendung, der es ermöglicht 16 Proben gleichzeitig auszuzählen. Durch Versuche ließ sich die obere Höchstmenge der Proben für die Countermessung bei 0,5 bis 1 ml festlegen. Bei einer Aktivität von 100 000 c.p.m. im Gesamtansatz von 2 ml ergibt sich bei einer minimalen Entnahmemenge von 200 μ l und 20%iger Inaktivierung eine Aktivität von 2000 c.p.m. im Überstand, sodaß diese Meßwerte im vernünftigen Meßbereich des Zählers liegen bei gleichzeitiger sparsamer Verwendung der Radioaktivität.

Bei einer Überprüfung der optimalen Meßdauer ergaben sich bei 200 μ l eingesetztem Tracerinsulin und einer Referenz von ca. 50 000 c.p.m. bei einer Meßdauer von 1, 2 und 5 Minuten unter Kontrolle von mehreren Bestimmungen nur sehr geringgradige Abweichungen der berechneten Aktivität pro Minute.

Zur Ermittlung der Genauigkeit des Zählers wurde lt. Tabelle 1 ein Versuch mit 200 μ l ^{125}I Insulin durchgeführt. Dasselbe Röhrchen mit 200 μ l ^{125}I Insulin (50 000 c.p.m.) wurde fünfzigmal hintereinander gezählt und die Abweichung in Form des Variationskoeffizienten ermittelt. Die Ergebnisse zeigt Tab. 1. Eine Meßdauer über 5 Minuten würde kaum eine qualitative Verbesserung der Meßergebnisse bringen.

Aus isotopentechnischer Sicht war damit zählertechnisch eine ausreichend präzise Messung der Inaktivierungsrate der insulinabbauenden Proteinase in menschlichen Erythrozyten mittels ^{125}I markierten Insulins gegeben.

TAB. 1 Genauigkeit der Bestimmungen am Zähler

1. Ermittlung der optimalen Meßdauer:

Versuch mit ^{125}I Insulin, 200 μl enthalten rund 50000 c.p.m.
Jeweils 5 malige Messung der Probe über einen Zeitraum von 1,
2 und 5 Minuten.
Die auf 1 Minute zurück berechneten Werte ergeben eine maximale
Differenz von 2 % zwischen 1 und 5 minütigem Meßzeitraum.

Standardabweichung aller Meßwerte: $s=2982$
Variationskoeffizient $v=0,06$

2. Ermittlung der Genauigkeit des Zählers:

Versuch mit ^{125}I Insulin, 200 μl enthalten rund 50000 c.p.m.
Nach 50 maliger Auszählung derselben Probe wird die Abweichung der
einzelnen Werte untereinander errechnet.

Standardabweichung aller Meßwerte: $s=2492$
Variationskoeffizient $v=0,05$

3.1.5. Präzision des Inaktivierungstestes

Im Abschnitt über isotopentechnische Details wurde der Fehler durch Counterzählung im Bereich von $v = 0,05$ (Variationskoeffizient) ermittelt. Um die Genauigkeit des Testes zu überprüfen und gleichzeitig die Hämolyseaufbereitung sowie die Pipettierungen beim Versuchslauf miteinzubeziehen, wurde eine Blutprobe nacheinander viermal in Doppelbestimmungen getestet und die Abweichungen gemäß Tab. 2 errechnet.

Es wird ersichtlich, daß durch Hb-Messungen ein Fehler bei wiederholter Bestimmung im Bereich von $v = 0,04$ entsteht. Der entsprechende Wert bei Counterzählungen nach Pipettierung liegt nahe dem früher bestimmten Wert bei Leerproben bei reiner Zählermessung. Relativ gering ist die Abweichung, ermittelt über den Gesamtansatz, bei wiederholter Bestimmung der gleichen Blutprobe. Es ergibt sich hierbei eine maximale Abweichung vom mittleren Meß-

Wert von 4,1%. Daraus wird ersichtlich, daß die Meßgenauigkeit etwa im Bereich der Präzision liegt, die von den angewandten Meßmethoden bzw. Meßgeräten erreicht wird. Dies erscheint für den Test als akzeptabel.

TAB.2 Präzision des Inaktivierungstestes:

1. Ermittlung der Meßgenauigkeit nach Pipettierung:

Versuch mit ^{125}I Insulin, 200 μl enthalten rund 50000 c.p.m.
Messung von 25 verschiedenen Proben mit je 200 μl

Standardabweichung aller Meßwerte: $s=3438$

Variationskoeffizient $v=0.069$

Als Vergleich aus TAB. 1 Meßgenauigkeit des Zählers
 $s=2492$ $v=0,05$

2. Genauigkeit der Doppelbestimmungen im Testablauf:

Dieselbe Hämolysatprobe wird viermal hintereinander (jeweils wiederum Doppelbestimmung!) getestet, und die maximal auftretende Abweichung in % des mittleren Meßwertes angegeben.

Maximale Abweichung vom mittleren Meßwert: 4,1%

3. Genauigkeit der Hb-Bestimmung im Hämolysat:

20 malige Bestimmung des Hb einer Hämolysatprobe Hb um 2,8 g/dl

Standardabweichung aller Meßwerte: $s=0,12$

Variationskoeffizient $v=0,04$

Ohne Einbuße an Genauigkeit konnte für die Untersuchung von Versuchspersonen die Probeentnahmemenge (Aliquot) von 500 μl auf 200 μl reduziert und damit die Anzahl der möglichen Messungen erhöht werden. Den Vergleich zeigt Abb. 1.

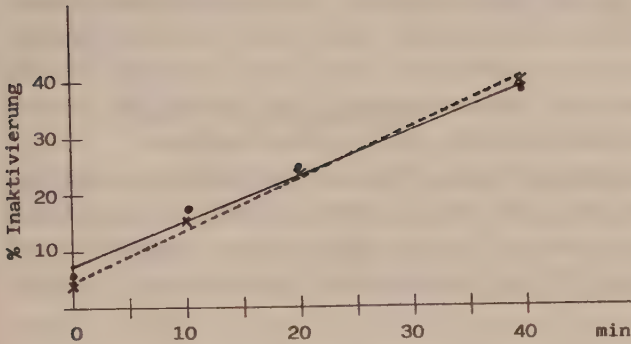


ABB. 1 Reduzierung der Probeentnahmemenge auf 200 µl

500 µl Probenentnahme

200 µl Probenentnahme

3.2. Einfluß verschiedener Faktoren auf den Aktivitätstest zur Messung der Insulinase

3.2.1. Gewinnung der Blutproben

Die Gewinnung der Blutproben mit Hilfe der Heparinisierung schien keine großen Probleme zu bereiten. Bei ausgefalleneren Patientenkollektiven jedoch, wie z.B. Neugeborenen oder Kleinkindern, mußte auf vorbereitete, bereits entnommene Blutproben zurückgegriffen werden. Da hierbei in den Kliniken größtenteils mit EDTA beschichteten Röhrchen bei der Blutentnahme gearbeitet wird, erschien es wünschenswert, den Test evtl. mit EDTA-Blut durchführen zu können. Für die Glutathioninsulintranshydrogenase wurde von Ansorge et al. (2) neben dem Glutathion auch dem EDTA eine

stimulierende Wirkung auf die Insulininaktivierung zugeschrieben. Hinweise für eine Interaktion zwischen Insulinase und EDTA sowie die Verwendung von EDTA-Blut waren in der einschlägigen Literatur nicht aufzufinden. Ausführliche Testversuche zwischen Heparinblut und EDTA-Blut waren deshalb nötig. Beim Vergleich von 20 Blutproben, einmal nach Heparinisierung, zum anderen bei Verwendung von EDTA-Röhrchen, zeigte sich folgendes Ergebnis:

Wird darauf geachtet, daß das Hämolysat annähernd gleiche Hb-Werte aufweist, so kann für die Proteinaseaktivität kein signifikanter Unterschied zwischen EDTA- und Heparin-Blut festgestellt werden. Das Ergebnis für die ausgewählten Blutproben ist in Abb. 2 aufgeführt.

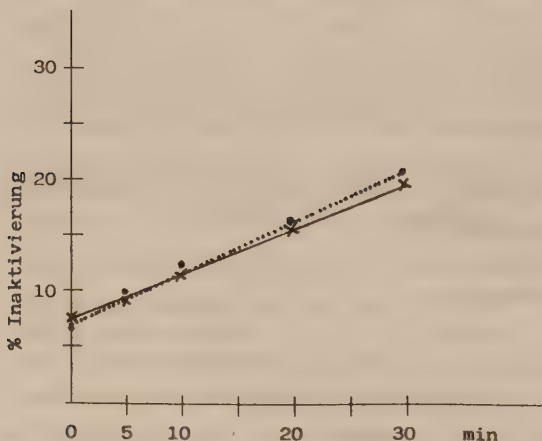


ABB. 2 Vergleich zwischen EDTA und heparinisiertem Blut

Standardversuch gleicher Hb von 2,2 g/dl 1,0 mE (0,5 mE/ml)
Insulin im Ansatz

●... EDTA x— Heparin

Damit darf gefolgert werden, daß EDTA-Blut im gleichen Umfange für den Test geeignet ist. In Zukunft bedeutet das eine ungemeine Arbeitserleichterung bei der Untersuchung ausgefallener Krankheitsbilder.

3.2.2. Einfluß der Lagerungszeit

Bei dem oben beschriebenen ausgiebigen Experimentieren mit EDTA-Blut fiel auf, daß bei üblichem Vorgehen zur Konservierung, d.h. Einfrieren der Hämolysatproben, beim EDTA-Blut schon nach einem Tag ein merklicher Abfall der maximal erreichbaren Aktivität auftrat. Dieses Phänomen war bei Heparinblutproben bisher nicht aufgefallen. Kolb und Standl hatten in ihrer Arbeit (25) auf einen Abfall der biologischen Aktivität nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen des Enzyms hingewiesen. Deshalb wurden Heparin- und EDTA-Blutproben einer genaueren Untersuchung bezgl. der Langzeithaltbarkeit nach Einfrieren unterzogen. Bei Zimmertemperatur unterliegen beide Blutproben dem aus der Klinik bekannten Verfall. Nach ca. einem Tag sind sie nicht mehr verwendbar. Als Konservierungsmethode der Wahl bietet sich das Einfrieren der Hämolysatproben an. Es sei noch erwähnt, daß beim Einfrieren von nativem EDTA-Blut und auch von Heparinblut vor der Hämolyse durch Aqua dest. nach dem Wiederauftauen eine nur sehr minimale Inaktivierungsrate gefunden wird. Wird hingegen das Blut frisch verarbeitet bis das Hämolysat vorliegt und dieses eingefroren, so ergibt sich ein Aktivitätsverlust im Verhältnis zur Zeit, wie ihn Abb. 3 zeigt. Wie aus Abb. 3 ersichtlich wird, nimmt sowohl die Inaktivierungsrate von EDTA- wie auch die von Heparin-Hämolysat kontinuierlich ab. Dabei ist diese Abnahme bei EDTA-Blut insgesamt größer. Für die Praxis ergibt sich daraus daß die EDTA-Blutproben möglichst am Tage der Abnahme auch verarbeitet werden sollten. Trotz der geringeren Abnahme bei Heparinblut ist auch dort eine sofortige Verarbeitung anzuraten.

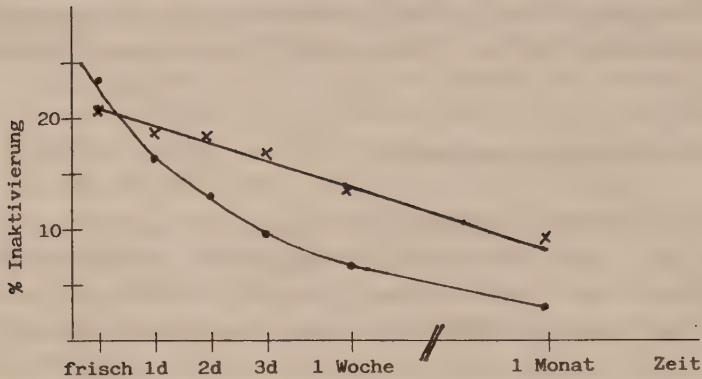


ABB. 3 Haltbarkeit des Hämolyats

bei Lagerung unter -16°C

Es wurde der Test unter Standardbedingungen durchgeführt

● EDTA × Heparin zur Gerinnungshemmung

3.2.3. pH-Abhängigkeit der Insulinaseaktivität

Zu den schon bekannten Bedingungen des Testes zählte der pH-Bereich. Von Kolb und Standl (26,27), Tschesche et al. (46) und Brush (5) wurde ein Optimum im physiologischen Bereich festgestellt. Das Verhalten des Testes bei wechselndem pH zeigt Abb. 4. Daraus ergibt sich der optimale pH im physiologischen Bereich um 7,4.

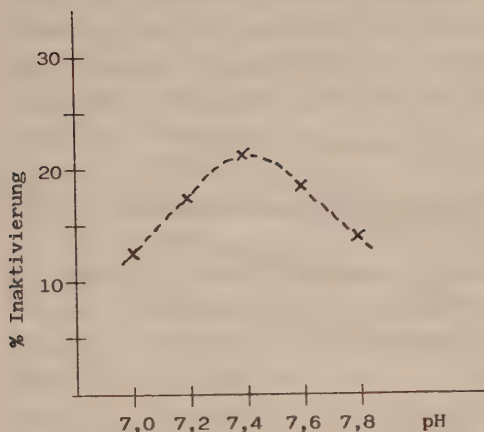


ABB. 4 pH Abhängigkeit der Insulinaseaktivität

Beim Test unter Standardbedingungen wurde der pH-Wert des 10 mM Tris/HCl-Puffers variiert.

3.2.4. Temperaturabhängigkeit

Um den Einfluß der Umgebungstemperatur auf den Versuchslauf und ihr Optimum zu klären, wurde der gleiche Testansatz bei verschiedenen Umgebungstemperaturen im Schüttelwasserbad gestartet. Unterhalb von 20° C findet sich eine kaum mehr meßbare Inaktivierungsrate innerhalb der Versuchszeit von 35 Minuten. Oberhalb von 60° C ist wahrscheinlich wegen Inaktivierung des Enzyms ebenfalls keine Aktivität mehr nachweisbar. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, nimmt die Inaktivierungsrate von Insulin pro Zeiteinheit bei steigender Temperatur zu. Hierbei ist zu bemerken, daß oberhalb 37° C, z.B. bei 44° C, innerhalb von kürzerer Zeit (ca. 10 Minuten) ein Gipfel erreicht wird und danach die Inaktivierungsrate nur noch langsam zunimmt. Unterhalb von 37° C verläuft die Inaktivierungskurve flacher, aber längere Zeit linear. Nachdem oberhalb von ca. 60° C eine totale Inaktivie-

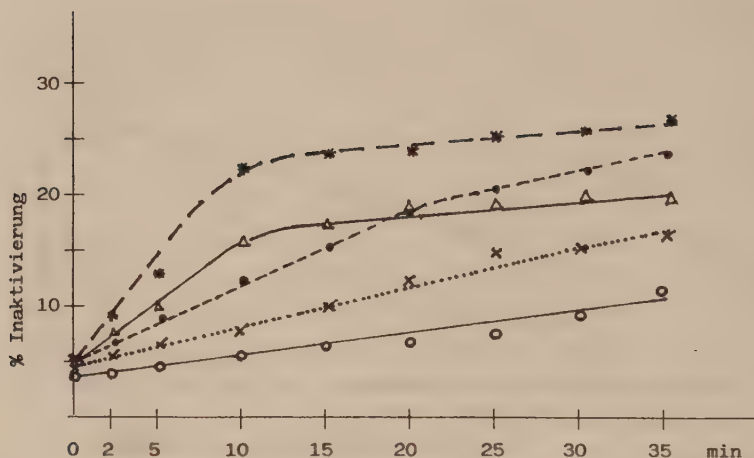


ABB. 5 Abhängigkeit der Insulinaseaktivität von der Temperatur

Standardversuch

○— 23° x— 30° ●— 37° ✱— 44° △— 51° C

rung des Enzyms stattfindet, im Bereich zwischen 37 und 60° ein steiler Anstieg mit Gipfel erreicht wird, kommen für einen Testversuch eigentlich nur die Temperaturbereiche zwischen 20 und 37° in Frage, da hier ein größtenteils linearer Bezug zu finden ist. Da geplant war, den Test unter möglichst physiologischen Bedingungen durchzuführen, wurde eine Temperatur von 37° C gewählt. Bei diesen Temperaturbedingungen herrscht bis zu einer Versuchsdauer von 30 Minuten eine lineare Beziehung zwischen Abbaurrate und Zeit. Um die Linearität des Abbauvorganges zu kontrollieren und mögliche Gipfelpunkte auszuschließen, wurden über die gesamte Testzeit hinweg Probeentnahmen durchgeführt. In der Praxis bedeutet das, daß man nach 0, 5, 10, 20 und evtl. immer weiteren 10 Minuten Proben entnimmt und auszählt. Bei der erwähnten Versuchstemperatur von 37° C erwiesen sich 20 Minuten Versuchsdauer als das Optimum, um genügend Aussage-

kraft zu gewinnen. Diese konstante Temperatur konnte nur ein Schüttelwasserbad gewährleisten. Die Testansätze wurden während des gesamten Versuchslaufs in diesem Warmwasserbad auf einer konstanten Temperatur gehalten und gleichzeitig eingehend durchgemischt.

3.2.5. Abhängigkeit von der Insulinkonzentration

Die bisher in den Versuchsansätzen verwendete Konzentration von Insulin, nämlich 1 mE (0,5 mE/ml) im Versuchsansatz, entspricht etwa der zehnfachen Konzentration, wie sie in der menschlichen Zirkulation vorgefunden wird. Es erscheint naheliegend, nachdem schon die Temperatur mit 37° C im physiologischen Bereich gehalten werden kann, nun auch die Insulinkonzentration möglichst den natürlichen Bedingungen anzupassen.

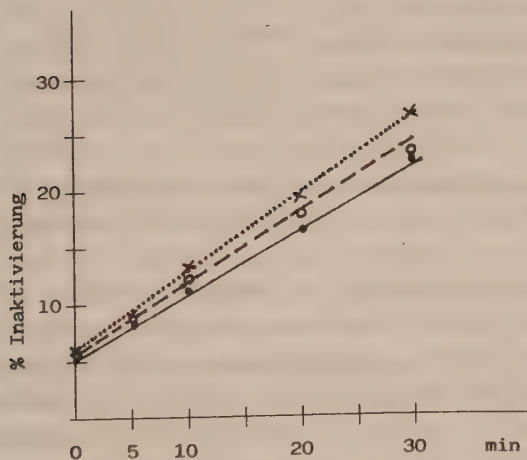


ABB. 6 Abhängigkeit von der Insulinkonzentration

Die Insulinkonzentration im Ansatz wurde schrittweise bis auf 0,1 mE (0,05 mE/ml) in den physiologischen Bereich herabgesetzt.

● — 1 mE ○ — 0,5 mE ✕ ... 0,1 mE im Testansatz von 2 ml

Bei mehreren Versuchsreihen mit unterschiedlichen Blutproben wurde schrittweise die Konzentration der Insulinlösung von 1 mE bis auf 0,1 mE im Ansatz herabgesenkt. Eine Aufstellung der Meßwerte bei 1, 0,5 und 0,1 mE im Ansatz liefert Abb. 6. Bei niedriger Konzentration des Insulins verläuft die prozentuale Abbaugeschwindigkeit etwas schneller, sodaß ohne Bedenken mit einer physiologischen Konzentration von 0,1 mE Insulin im Ansatz (entsprechend 50 μ E/ml) gearbeitet werden kann. Damit sind nun im Gegensatz zu den Versuchen mit der Glutathioninsulintranshydrogenase für die Untersuchung der spezifischen Insulinase in menschlichen Erythrozyten weitgehend physiologische Versuchsbedingungen vorhanden.

Wie bereits erwähnt, war die Spezifität des Testes für eine insulinspaltende Proteinase von vorangegangenen Arbeiten in Form der Analyse der entstehenden Abbauprodukte bereits vorgenommen worden. Untersucht wurde lediglich noch die Reaktion der spezifischen Insulinase auf verschiedene Chargen von Insulin bzw. die Reaktion auf das zur Messung benötigte 125 I markierte Insulin. Die Auswirkung auf das Tracerinsulinsystem ist so zu verstehen, daß das 125 I markierte Insulin genauso dem Abbau unterliegt wie das im Testansatz vorhandene Rinderinsulin. Logischerweise steigt beim Weglassen des Insulins die Inaktivierungsrate des mit Jod markierten Insulins stark an. Diesen Versuch zeigt Abb. 7.

Zusätzlich stand mir durch die Arbeit von Kolb und Standl (25) eine kleine Menge von gereinigtem Enzym aus menschlichen Erythrozyten zur Verfügung. Der Versuch mit dem Einsatz von gereinigtem Enzym statt dem aus menschlichen Erythrozyten gewonnenen Hämoly-
sats war insofern interessant, weil man hiermit mit ziemlich großer Sicherheit überprüfen konnte, ob der aufgestellte Test spezifisch auf die Insulinase reagiert. Wie ebenfalls in Abb. 7 aufgeführt, ergibt sich beim Vergleich der zwei vorher erwähnten Versuche mit einem Normallauf ein charakteristisches Bild. Beim Weglassen

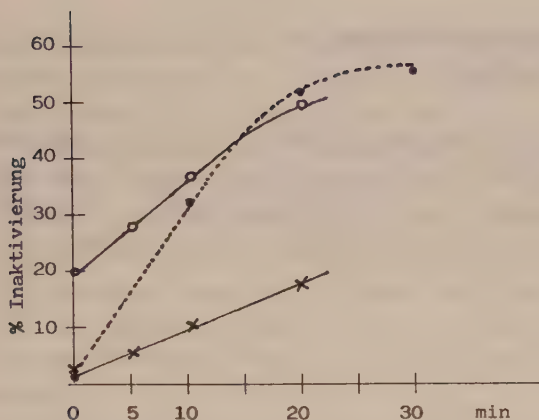


ABB. 7 Einfluß der Insulinkonzentration

Einfluß von Rinderinsulin und angereichertem Enzym (Insulinase)

✕ Normalbedingungen Zugabe von Hämolytat

Standardprobeversuch 1 mE (0,5 mE/ml) Insulin im Ansatz

•••• ohne Zusatz von nativem Insulin nur ^{125}I Insulin Marker
Zugabe von Hämolytat

○ Normalbedingungen

Standardprobeversuch 1 mE (0,5 mE/ml) Insulin im Ansatz

Zugabe von gereinigtem und angereichertem Enzym (Insulinase
aus Erythrozyten)

des Rinderinsulins steigt die Inaktivierungskurve vom selben Nullwert steiler an wie beim Normalversuch, was zeigt, daß nun die gesamte Inaktivierungspotenz des Enzymsystems sich auf das ^{125}I markierte Insulin verlegt. Hierbei wurde Hämolytat wie im Normalversuch eingesetzt. Arbeitet man mit gereinigtem Enzym, so verläuft die Inaktivierungskurve steiler und der Beginn der Reaktion ist zu einem höheren Nullwert verschoben, bedingt durch die labortechnische Verzögerung bei der Nullwertprobeentnahme.

3.2.6. Sulfhydryl-Gruppen-Abhängigkeit der spezifischen Insulinase

Tschesche et al. (29) und Kolb und Standl (25, 26, 27) beschrieben eine Abhängigkeit der hier untersuchten Insulinase von SH-Agenzien. Eine Anwesenheit von SH-Gruppen-reichen Substanzen zeigt eine deutliche Stimulierung des Inaktivierungsprozesses.

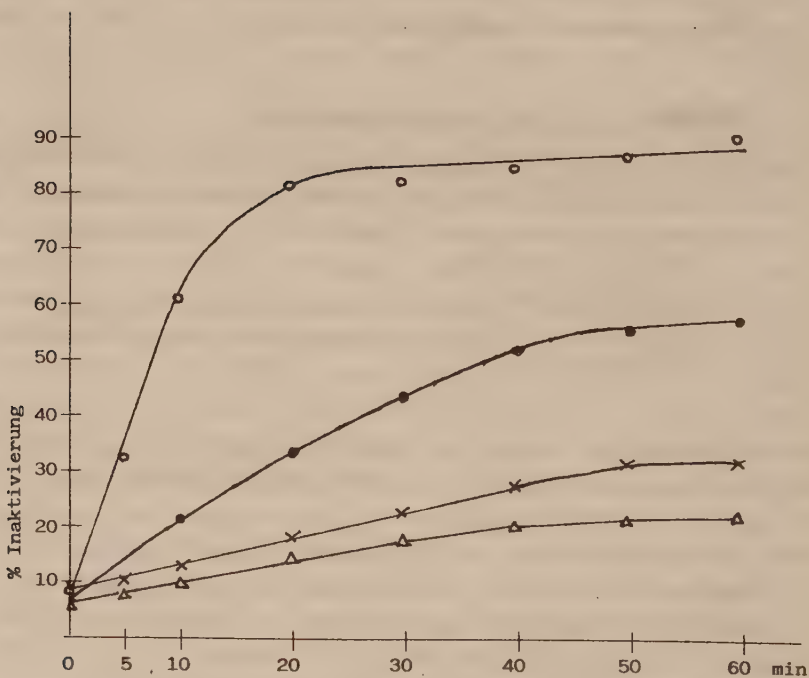


ABB. 8 Abhängigkeit der Insulinaseaktivität von Dithioerythrit

△	Referenzbestimmung	kein Zusatz	Standardprobeversuch	} im Ansatz
○	Zusatz von	1 mM Dithioerythrit		
●	"	0,1 mM	"	
×	"	0,01 mM	"	

Die Abhängigkeit von SH-Gruppen stimulierenden Agenzien wurde unter Verwendung von Dithioerythrit gemessen. Abb. 8 zeigt die Versuchsreihe mit verschiedenen Konzentrationen von Dithioerythrit im Versuchsansatz. Im Bereich von 0,01 mM Dithioerythrit zeigt sich kein wesentlicher Unterschied zum normalen Versuchsablauf. Steigert man die Konzentration bis hinauf zu 1 mM, so ergibt sich am Anfang des Versuchs ein steiler Anstieg der Kurve, d.h. eine massive Inaktivierungsrate, die sich nach Verbrauch des Insulins abflacht. Daraus läßt sich schließen, daß der Zusatz von Dithioerythrit eine starke Stimulierung auf die Insulinase bewirkt.

Unter den von Kolb und Standl (26, 46) in ihrer Arbeit verwendeten Hemmsubstanzen für Sulfhydrylgruppen wurde das N-Äthylmaleinimid ausgewählt, weil von ihm bekannt war, daß es die insulininaktivierende Proteinase hemmt. In Abb. 9 ist diese Situation

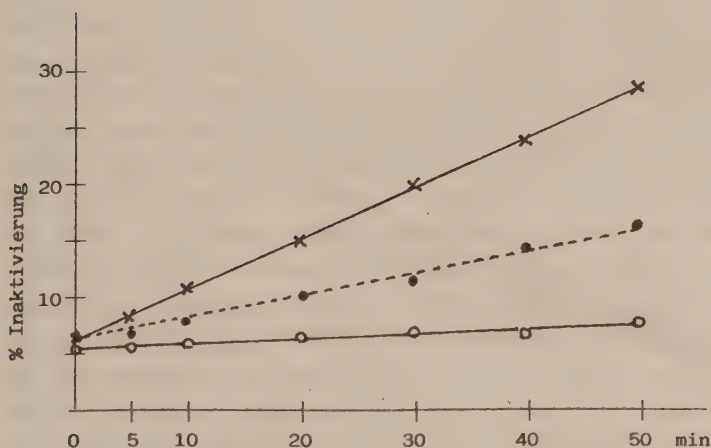


ABB. 9 Abhängigkeit der Insulinaseaktivität von N-Äthylmaleinimid

- × Referenzbestimmung kein Zusatz Standardprobeversuch
- Zusatz von 0,1 mM N-Äthylmaleinimid
- " " 1 mM " " " }

im Ansatz

dargestellt. Wird durch 0,1 mM N-Äthylmaleinimid die Reaktion auf ca. die Hälfte herabgesenkt, so kommt beim Einsatz von 1 mM N-Äthylmaleinimid im Versuchsansatz unter den bekannten Versuchsbedingungen die Inaktivierungsreaktion fast vollständig zum Erliegen. Dieses Ergebnis deckt sich sehr genau mit dem von Kolb und Standl beschriebenen Verhalten der Insulinase.

In den menschlichen Erythrozyten befinden sich hohe Konzentrationen an reduziertem Glutathion. Wie von Kolb und Standl (25, 46) gezeigt werden konnte, stimuliert reduziertes Glutathion die insulinabbauende Proteinase ähnlich wie Dithioerythrit. Um eine spezifische Messung der Insulinase zu ermöglichen, muß der stimulierende Einfluß des reduzierten Glutathion abgeblockt werden, ohne das insulinabbauende Enzym zu hemmen. So sind z.B. N-Äthylmaleinimid und ähnliche Hemmstoffe nicht geeignet, da sie auch das Enzym vollständig hemmen. Unter den Substanzen, die

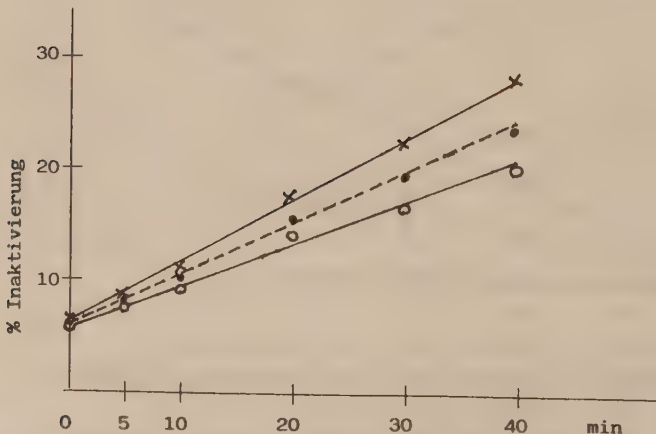


ABB. 10 Abhängigkeit der Insulinaseaktivität von Jodacetamid

- x — Referenzbestimmung kein Zusatz Standardprobeversuch
● — Zusatz von 0,1 mM Jodacetamid
○ — " " 1 mM " } im Ansatz

SH-Gruppen blockieren, aber sehr wenig Einfluß auf die Insulinase nehmen, wurde schon früher von Kolb und Standl (46) das Jodacetamid hervorgehoben. Jodacetamid scheint zwar die SH-Gruppen von Glutathion zu blockieren, nicht aber mit den etwas versteckter angeordneten SH-Gruppen des Enzyms zu reagieren. In Abb. 10 ist die Hemmwirkung von verschiedenen Jodacetamid-Konzentrationen gegenüber der Insulinase dargestellt. Im Vergleich zur Leerprobe ergibt sich bei 0,1 mM Jodacetamid im Ansatz eine Verminderung der Inaktivierungsrate um ca. 10 %. Steigert man die Jodacetamidkonzentration auf das Zehnfache, so ergibt sich eine Aktivitätsabnahme um 20 %. Jodacetamid in einer Konzentration von 1 mM im Ansatz dürfte damit für den Versuchsablauf ausreichen, um den Einfluß von reduziertem Glutathion wirksam zu unterdrücken. Beim Vergleich der Ergebnisse aus Abb. 10 mit der in Abb. 9 aufgeführten Hemmwirkung des N-Äthylmaleinimids zeigt sich, daß das Jodacetamid SH-Gruppen-abblockend wirkt ohne wesentliche Veränderung des Testlaufes.

Auch die Kombination von Dithioerythrit und Jodacetamid im Ansatz zeigt, daß ab einer gewissen Konzentration von Jodacetamid der SH-Gruppen stimulierende Effekt abgeblockt wird. Schon bei einer Konzentration von 0,5 mM Jodacetamid erreicht die Kurve in Anwesenheit von Dithioerythrit einen Wert, der dem Verlauf des normalen Versuchsansatzes annähernd entspricht, wie Abb. 11 zeigt. So dürfte bei einer Konzentration von 1 mM Jodacetamid auch beim Einsatz von Dithioerythrit der SH-Gruppen abhängige Stimulierungseffekt eliminiert werden und im Versuchsansatz eine relativ genaue Messung der Proteinaseaktivität gegeben sein.

Aus dem Bereich der Hemmstoffe sei noch kurz ein weiteres Ergebnis der Versuche eingefügt. Um die Hämolyse mit Aqua dest. bei der Hämolsataufbereitung noch zu verbessern, wurde versucht mit dem handelsüblichen Präparat Zaponin^R eine bessere Ausbeute bei der Hämolyse zu erreichen. Dabei wurde jedoch das insulinabbauende Enzym vollständig inaktiviert. Auch bei Einsatz von

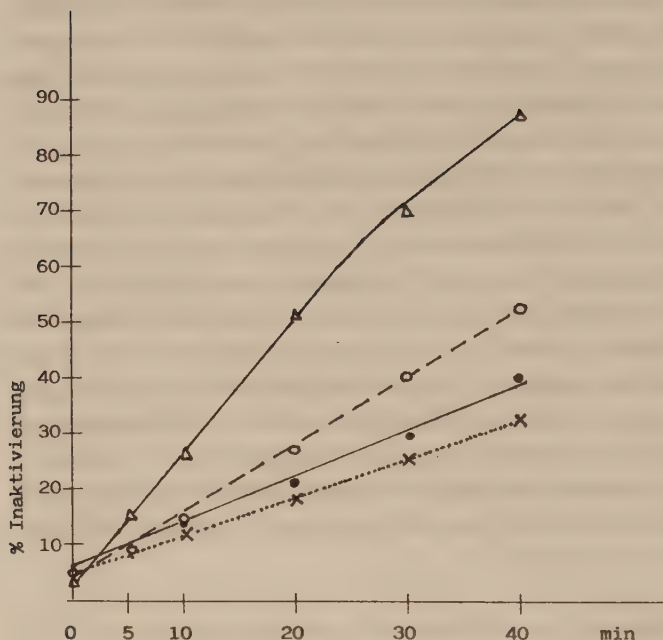


ABB. 11 Abhängigkeit der Insulinaseaktivität von Jodacetamid in Kombination mit Dithioerythrit

- ▲ Standardprobeversuch mit 0,1 mM zusätzlich im Test vorhandenem Dithioerythrit
 ○ - zusätzlich 0,1 mM Jodacetamid
 ● " 0,2 mM " im Test
 x " 0,5 mM "

massiven Konzentrationen von Dithioerythrit zeigte sich in Kombination mit zaponinhämolyisiertem Blut keinerlei Aktivität.

Ein Einfluß von unspezifischen Proteinase auf den Versuchslauf wurde bisher nicht definitiv nachgewiesen. Doch läßt sich dieser Einfluß, wie bereits von mehreren Autoren und zuletzt von Kolb und Standl (25) beschrieben, vernachlässigen, da der zur pH-Aufrechterhaltung eingesetzte Albuminpuffer in einer Konzentration von 1 mg/ml sehr wirksam vor Proteinase (Trypsin u.ä.) schützt.

3.3. Testaufbau zur Messung der Insulinaseaktivität von Patientenkollektiven

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Entwicklung des Testes in einzelnen Stufen ausführlich beschrieben, an dieser Stelle sei jetzt ein kurzer Überblick über den Testablauf gegeben, wie er später bei der Untersuchung der Testpersonen verwendet wurde.

3.3.1. Erythrozytenhämolysat

Zunächst werden ca. 4 ml venöses Blut vom Patienten gewonnen und in handelsübliche EDTA-Röhrchen verbracht. Nach Auffüllen mit physiologischer NaCl-Lösung (Isoton^R) und mehrmaligem Schütteln werden die Röhrchen zentrifugiert (3000 U/min für 10 Minuten) und der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach zweimaligem Wiederholen dieses Waschvorgangs liegt eine gereinigte Erythrozytensuspension vor. 200 µl der Suspension werden nun mittels einer Eppendorf-Pipette in ein Reagenzglas überführt, mit 2 ml Aqua dest. versetzt, geschüttelt und damit bei Zimmertemperatur hämolysiert. Für den in Abb. 12 aufgezeigten standardisierten Testversuch bedeutet das, daß bei einem Ausgangs-Hb von 18,7 nun im fertigen Hämolysat ein Hb von ca. 2,8 vorgefunden wird.

3.3.2. Testansatz

Ausgehend von 0,5 ml Albuminpuffer (pH 7,4) werden in ein Glas 0,2 ml Insulinlösung (0,1 mE; 0,5 mE/ml) und 0,4 ml einer 2,5mM Jodacetamidlösung (Jodacetamid in Aqua dest. gelöst) zupipettiert, sodaß Jodacetamid 1 mM im Ansatz vorliegt. 0,4 ml Aqua dest. werden beigelegt. Dem Ansatz wird jetzt 0,2 ml ¹²⁵I Insulinlösung zupipettiert, gleichzeitig dieselbe Menge in ein erstes Zählröhrchen gegeben, sodaß sowohl der gesamte Ansatz wie auch die Referenz-

probe im Röhrchen ca. 100 000 c.p.m. aufweisen. Der Testansatz wird im Schüttelwasserbad bei 37° C ca. 5 bis 10 Minuten vorinkubiert.

3.3.3. Testdurchführung

Mit einer Eppendorf-Pipette werden 0,5 ml Hämolysat zugegeben, durchmischt und sofort 0,2 ml entnommen, in einem bereitstehenden Eppendorf-Röhrchen mit derselben Menge TCA versetzt, geschüttelt und abzentrifugiert. Vom Überstand werden 0,2 ml in ein Meßröhrchen pipettiert und zur Messung bereitgestellt. Dieser Entnahmevorgang wird bei Start der Reaktion, nach 5, 10 und 20 Minuten wiederholt. In den Vorversuchen zeigte sich, daß die Meßkurve innerhalb der ersten 20 Minuten nahezu geradlinig verläuft und somit ein guter Referenzbezugspunkt gegeben ist. Grundsätzlich wäre bei einer konstanten Abbauproduktivität der 0- und der 20-Minuten-Wert ausreichend. Um jedoch Meßfehler und Ungenauigkeiten möglichst präzise auszugleichen, wird auch der 5- und 10-Minuten-Wert bestimmt. Somit kann eine möglichst geradlinige Beziehung zwischen Inaktivierungsrate und Zeit gesichert werden.

Abb. 12 zeigt einen Standardversuch, der unter den vorher beschriebenen Bedingungen über 60 Minuten durchgeführt wurde. Dazu kam, wie bei den meisten Vorversuchen, das Blut des Autors zur Verwendung. Es handelt sich hierbei um eine Person männlichen Geschlechtes, 23 Jahre alt, 70 kg schwer bei einer Größe von 1,80 m. Der Ausgangs-Hb-Wert lag bei 18,7 g/dl. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß die Inaktivierungskurve bis 20 Minuten geradlinig verläuft. In diesem Zeitraum werden ca. 14% der im gesamten Testansatz vorhandenen Insulinmenge inaktiviert. Um eine vergleichende Darstellung zu ermöglichen, ist es notwendig nicht nur bei der Inaktivierung in Prozenten der gesamten vorliegenden Radioaktivität zu rechnen, sondern gleichzeitig sowohl die Menge des eingesetzten Insulins als auch den Hb-Gehalt der

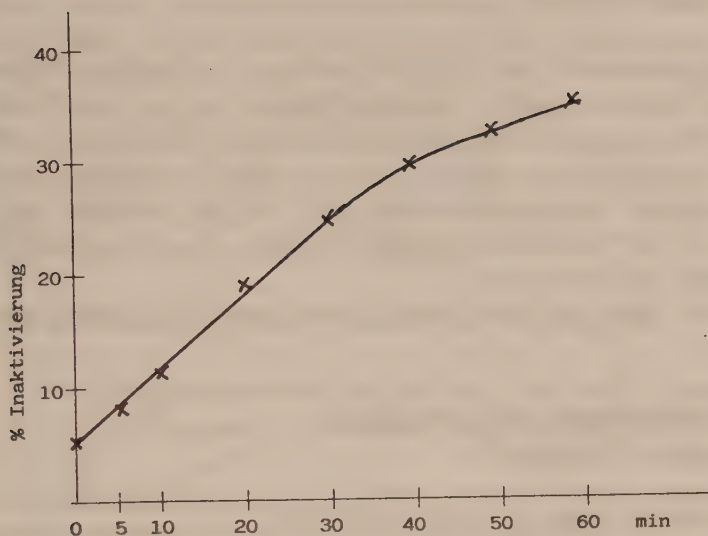


ABB. 12 Typische Inaktivierungskinetik der Insulinase aus Erythrozyten bei einer gesunden Normalperson beim standardisierten Testversuch für Patientenkollektive

Normalperson 23 Jahre Testansatz laut Beschreibung

Hämolysatlösung in den Vergleichswert einfließen zu lassen. Bisher wurde die Inaktivierungsrate in Prozent der gesamteingesetzten Insulinmenge (rechnerisch: gesamte Radioaktivität) angegeben und zwar berechnet aus dem Nullwert und dem Wert nach 20 Minuten. Nachdem im Test 0,1 mE Insulin vorhanden sind, entsprechend 100 μ E, kann die in Prozenten angegebene Inaktivierungsrate leicht in μ E inaktiviertes Insulin umgerechnet werden. Als Bezugswert in der Reihenuntersuchung wurde die Inaktivierungsrate im Verlauf von 20 Minuten herangezogen. Der aus der Untersuchung ermittelte Wert gibt somit die Inaktivierungsrate pro Minute aus einer Durchschnittsrechnung aus dem Versuchslauf über 20 Minuten an.

3.3.4. Hämoglobintestung

Die Inaktivierungsrate wird auf den Hb-Gehalt im Hämolysat bezogen. Geht man von einem durchschnittlichen Hb von 14 g/dl im nativen Blut aus, so ergibt sich im Hämolysat ein Hb-Gehalt von ungefähr 2,4 g/dl. Der Hb-Gehalt in der Hämolysatlösung wurde auf die übliche Weise photometrisch bei 546 nm bestimmt (40). Der aus der Untersuchung ermittelte Meßwert hat dann folgende Benennungen und Dimensionen:

Der Meßwert gibt die pro Minute inaktivierten μE Insulin pro g Hb an.

3.4. Untersuchungen am Normalkollektiv und an Diabetikern

3.4.1. Übersicht über das Patientenkollektiv

Grundsätzlich ist zu bemerken, daß bei einer Arbeit dieser Art das Problem der Zufallsauswahl der Patienten wahrscheinlich nie ganz zur Zufriedenheit der Statistiker im Sinne einer vollständigen Randomisierung gelöst werden kann. Eine gewisse Manipulation ergibt sich schon daraus, daß man versucht nur gesunde Patienten in die Untersuchung einzubeziehen, daß aber Kollektive, die am Krankenhaus und in Praxen auftreten, meist irgendwie erkrankt sind. In dieser Hinsicht muß man also gewisse Kompromisse eingehen.

Insgesamt wurden 253 Personen untersucht, davon waren 48 wegen später erkannter Krankheiten bzw. nicht standardisierter Proben-gewinnung (Kinder, Neugeborene) nicht in die Statistik aufnehm-bar. So ergibt sich ein Patientenkollektiv von 205 Personen, von denen die Versuchsvoraussetzungen genau protokolliert wurden. Die Auswahl erfolgte, soweit das bei einer Studie dieser Art mög-lich ist, zufällig. Das Patientengut rekrutiert sich aus Kollektiven

des Städt. Krankenhauses Harlaching, der Diabetikerabteilung des Städt. Krankenhauses Schwabing, einer internistischen Praxis, einer Kinderpraxis und einer großen Zahl von Einzelpersonen. Vorher festgelegte Ausschlusskriterien waren: Manifeste internistische Krankheiten, medikamentöse Therapie, Diabetes nur als Verdachtsdiagnose. Kein Ausschlusskriterium waren kleinere chirurgische Erkrankungen, nachträglich festgestellte Parameter, wie z.B. Anämie, wurden extra indiziert.

Die 205 erfaßten Patienten gliedern sich wie folgt auf:

174 Normalpersonen, davon 102 ♀ und 67 ♂ (5 Sonderfälle)
 31 Diabetiker, davon 16 ♀ und 15 ♂

Die Geschlechtsaufteilung ergibt sich aus der Zufallsauswahl. Die für die Statistik erfaßte Personengruppe zeigt Tab. 3.

TAB. 3 Übersicht des Gesamtuntersuchungskollektivs

Gesamtpersonenzahl: 205

davon	121 ♀	59%	102 ♀	50%	Normalpersonen
			16 ♀	8%	Diabetikerinnen gesamt
			6 ♀	3%	" Typ I
			3 ♀	2%	Schwangere Typ I
			7 ♀	3%	Diabetikerinnen Typ II
			2 ♀	1%	Sonderfälle
			1 ♀		Schwangerschaft
	84 ♂	41%	67 ♂	33%	Normalpersonen
			15 ♂	7%	Diabetiker gesamt
			9 ♂	4%	" Typ I
			6 ♂	3%	" Typ II

Bei einer Gesamtpersonenzahl von 205 überwiegen die Vertreter des weiblichen Geschlechts mit 121.

3.4.2. Überblick über die Diabetiker-Gruppe

Insbesondere bei der Gruppe der Diabetiker ergaben sich die oben erwähnten Probleme bei der Zufallsauswahl. Auch hier wird schon eine Vorauswahl dadurch getroffen, daß die Patienten mit schwererer Erkrankung durchwegs nur im Krankenhaus aufgefunden werden. Die Problematik zeigte sich auch darin, daß nachträglich ein nicht geringer Teil der untersuchten Patienten wieder aus dem Versuchsprogramm gestrichen werden mußte, weil sich bei ihnen Begleitkrankheiten zeigten, von denen nicht sichergestellt werden konnte, daß sie keinen Einfluß auf die Untersuchung haben. Grundsätzlich wurden von allen Patienten, soweit als möglich, alle verfügbaren Daten in die Untersuchung mitaufgenommen. In der Praxis war es aber sehr schwierig bei allen Patienten die Körpergröße und das Körpergewicht (besonders bei Diabetikern vom Typ II) zur Bestimmung eines evtl. Übergewichtes zu ermitteln. Alter und Geschlecht wurden routinemäßig erfaßt, ebenso Hinweise für internistische Erkrankungen und evtl. diabetische Stoffwechsellaage. Speziell bei Diabetikern wurde nach Insulinverabreichung (Typ I) oder einer anderen medikamentösen Therapie (Typ II) geforscht. Nicht eingegangen werden konnte im Rahmen dieser Arbeit dagegen auf den Insulinspiegel im Verhältnis zur Inaktivierungsrate. Es wurde jedoch versucht, die Blutentnahme immer zum selben Zeitpunkt, d.h. vor Nahrungsaufnahme im Nüchternzustand durchzuführen. Schwierig gestaltete sich die Definition der Grenze zur diabetischen Stoffwechsellaage beim Diabetes vom Typ II. Bei Personen, die unbehandelt mehrmals einen Nüchternblutzucker über 140 mg/100 ml oder nach Glukosebelastung auf Werte über 200 mg/100 ml anstiegen, konnte man sicher davon ausgehen eine diabetische Stoffwechselsituation vor sich zu haben. Die Unterscheidung der Diabetiker im Protokoll wurde nach der anfangs angegebenen Definition in Typ I und Typ II durchgeführt. Die Einteilung erfolgte zwischen insulinpflichtigen und übrigen Diabetikern. Beim Typ II wurde bei Patienten in der Klinik auch

ein vorhandenes Übergewicht genau ermittelt und registriert. Soweit möglich wurde die jeweilige Erkrankungsdauer miterfaßt.

3.5. Auswertung der Ergebnisse

3.5.1. Protokollführung

Zur Technik des Protokolls sei folgendes erwähnt:

Die Patienten wurden nach Geschlecht aufgeteilt und getrennt registriert. Zugleich wurde eine Einteilung nach dem Alter der Patienten in Zehnjahresdekaden durchgeführt. Ursprüngliches Ziel und Ausgangspunkt der Arbeit war die Untersuchung der Inaktivierungsaktivität in menschlichen Erythrozyten in verschiedenen Altersstufen über ein breites Patientenkollektiv hinweg. Wie in der technischen Beschreibung erwähnt, wurden bei allen Messungen Doppelbestimmungen durchgeführt. Durch diese Doppelbestimmungen und die anschließende Mittelung wurde bei groben Ausreißern eine gewisse Milderung der Meßfehler gewährleistet. Angesichts der oben angeführten Abweichungen und der hohen erreichten Meßgenauigkeit darf man diese Maßnahme vielleicht nur als zusätzliche Sicherheit ansehen. Bezgl. des Rechenmodus ist darauf hinzuweisen, daß zwar beim Hb auf zwei Stellen hinter dem Komma gerechnet wurde, diese Verfahrensweise mit zwei Stellen hinter dem Komma jedoch bei der Errechnung der Enzymaktivität eine falsche Meßgenauigkeit vorgetäuscht hätte. Bei einer Meßfehlerrate um die 5 % (siehe Tabelle Standardabweichungen) wäre eine Stelle hinter dem Komma, also im Zehnerbereich, nicht mehr mathematisch sinnvoll. Bei einem angenommenen Inaktivierungswert von $60 \mu\text{E}$ pro g Hb würde die anzugebende Abweichung ± 3 betragen. Ebenso wurde bei der Berechnung der Mittelwerte und der Statistik nicht mit einer Stelle hinter dem Komma weitergerechnet.

3.5.2. Untersuchung über die Altersabhängigkeit der spezifischen Insulinase

Zielsetzung bei der Untersuchung des Normalpatientenkollektivs war die Erforschung einer Altersabhängigkeit der spezifischen Inaktivierungskapazität der Insulinase. Zur genaueren Analyse wurde das Patientenkollektiv in Zehnerdekaden eingeteilt und die jeweiligen Durchschnittswerte miteinander verglichen. Eine zu Beginn der Arbeit vermutete Altersabhängigkeit der Inaktivierungspotenz der insulinabbauenden Enzyme in menschlichen Erythrozyten konnte durch genauere Analysierung nach Abschluß des Normalpatientenkollektivs nicht nachgewiesen werden. Wie aus Tab. 4 ersichtlich, ergibt sich bei der Aufstellung der Durchschnittswerte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Dekaden. Aus dem Zahlenmaterial der Tab. 4 ist lediglich ersicht-

TAB.4 Durchschnittswerte der einzelnen Altersgruppen

Alter	Geschlecht	Durchschnittswert $\bar{x}$	Anzahl
0 - 10	♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂ ♂	67	5
		69	4
11 - 20		64 (99)	11 (2)
		69 (110)	2 (1)
21 - 30		53 (90)	12 (2)
		54	9
31 - 40		53	19
		57 (103)	16 (2)
41 - 50		51 (125)	16 (3)
		59 (102)	10 (4)
51 - 60		55	19
		53 (109)	14 (5)
61 - 70		59 (120)	15 (4)
		48 (103)	8 (2)
71 - 80		48 (113)	5 (1)
		53 (136)	4 (1)
81		144	1

in $\mu\text{E/g Hb/min}$

Werte für Diabetiker in Klammern

lich, daß im jugendlichen Alter und im höheren Alter bei diabetischer Stoffwechsellage die Enzyminaktivierungsrate ansteigt.

3.5.3. Vergleichende Untersuchung zwischen Normal- und Diabetikerkollektiv

Die Gesamtdurchschnittswerte für die einzelnen Personengruppen ohne die in Tab. 3 aufgeführten Sonderfälle einschließlich Schwangerschaften ergeben sich wie in Tab. 5 aufgeführt.

TAB. 5 Durchschnittsberechnung der Enzymaktivität
inaktivierte μE Insulin/g Hb/min

<u>Normalpersonen:</u>			<u>Diabetiker</u>		
♀	n = 102	$\bar{X} = 56$	♀	n = 13	$\bar{X} = 115$
♂	n = 67	$\bar{X} = 56$	♂	n = 15	$\bar{X} = 107$
Gesamt:	n = 169	$\bar{X} = 56$		n = 28	$\bar{X} = 111$
Schwangerschaft:					
	n = 1	$\bar{X} = 51$		n = 3	$\bar{X} = 87$

Die Benennung ist, wie erwähnt, $\mu\text{E/g}$ Hb/1 min. Die in μE angegebene Inaktivierungsaktivität errechnet sich aus dem Einminutenmittelwert des über 20 Minuten laufenden Versuches. Im Normalpersonenkollektiv liegt der Durchschnittswert bei 56, wobei sich männliche und weibliche Patienten nicht unterscheiden. Der Durchschnittswert bei den Diabetikern liegt mit 111 wesentlich höher. Hierbei seien auch die Sonderfälle kurz erwähnt. Die Enzymaktivität einer Mutter bei normaler Schwangerschaft im 5. Monat liegt mit 51 im Rahmen des Durchschnittswertes. Drei Schwangerschaften zwischen 5. und 7. Monat bei diabetischer Stoffwechsellage und Insulintherapie liegen mit 87 bei sehr geringer Streuung der Einzelwerte zwischen Normalkollektiv und Diabetikern. Aufzuführen wäre noch eine Frühgeburt mit einem Wert von 44, zwei Patienten mit nachgewiesener Anämie mit 126 bzw. 112 deutlich über dem

Durchschnittswert liegend, sowie ein marcumarisierter Patient mit einem Wert von 36.

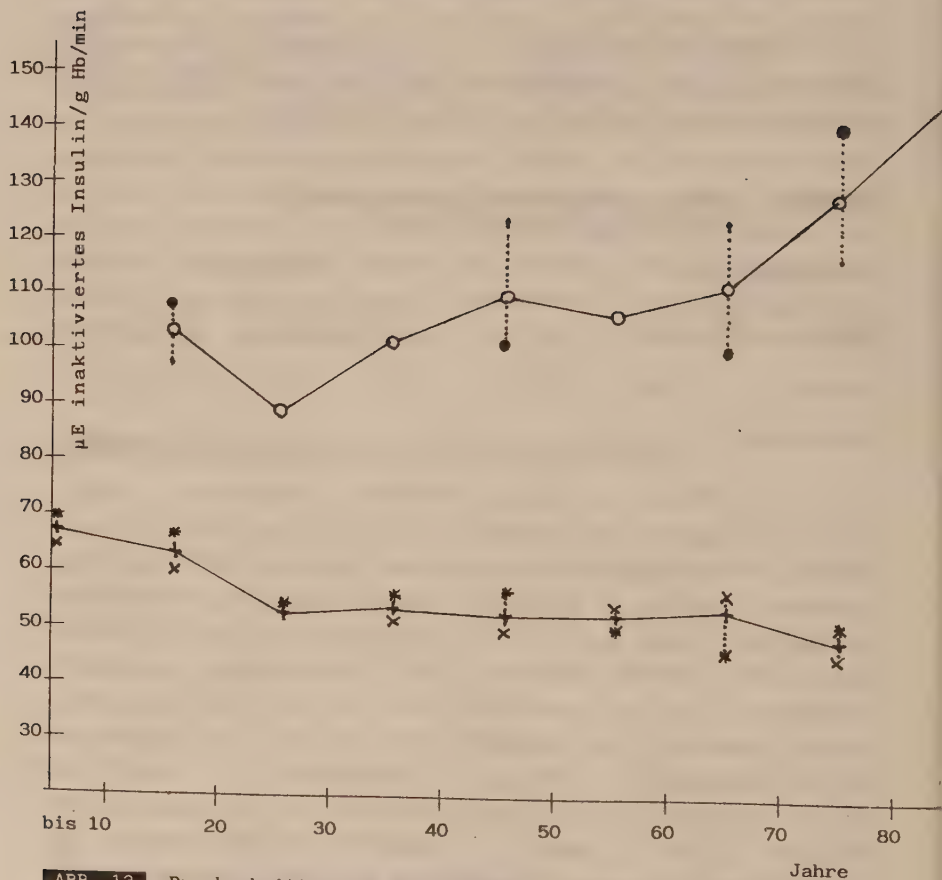


ABB. 13 Durchschnittswerte der Gesamtkollektive

+ Durchschnitt Gesamtkollektiv
 x $\hat{=}$ σ^2
 * $\hat{=}$ σ^2

○ Durchschnitt Diabetikerkollektiv
 • $\hat{=}$ σ^2
 ● $\hat{=}$ σ^2

Werden die Diabetiker streng vom Normalkollektiv getrennt, wie es nach vorher aufgeführten Kriterien der klinischen Diagnose durchgeführt wurde, so zeichnet sich ein deutlicher Unterschied in der durchschnittlichen Aktivität der Insulinase in menschlichen Erythrozyten ab. Den Unterschied dokumentiert in allen Einzelheiten Abb. 13.

Es sind hier die Durchschnittswerte der einzelnen Dekaden aufgeführt, sowohl für Normalkollektiv als auch für Diabetiker, zusätzlich wurden die Durchschnittswerte getrennt nach männlich und weiblich eingezeichnet. Wie aus Abb. 13 deutlich wird, überschneiden sich die höchsten Durchschnittswerte im Normalkollektiv in keinsten Weise mit den niedrigsten Werten der Diabetikergruppe. Auch bei den Einzelmeßwerten sind in den wenigsten Fällen Überschneidungen in das andere Kollektiv hinüber festzustellen. Dies läßt schon auf Grund der zeichnerischen Darstellung die Vermutung zu, daß bei diabetischer Stoffwechsellage die Enzymaktivität in menschlichen Erythrozyten höher liegt als bei normal gesunden Menschen.

3.5.4. Statistische Berechnung der Ergebnisse

Die in Abb. 13 angegebenen Meßwerte und graphischen Ergebnisse wurden durch statistische Berechnung wissenschaftlich abgesichert. Dabei lagen die Berechnungen auf zwei Schwerpunkten. Um einen evtl. Unterschied innerhalb der Zehnerdekaden im Normal- und Diabetikerkollektiv festzustellen, wurde ein Wilcoxon-Test (23, 34, 47) im erweiterten Sinne einer Varianzanalyse mit den Mittelwerten aus den einzelnen Zehnerdekaden angesetzt. Dieser Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen einzelnen Zehnerdekaden. Wie schon die Ergebnisse aus Tab. 4 aufzeigen, scheint auch nach genauer statistischer Untersuchung selbst im Diabetikerkollektiv keine Altersabhängigkeit zu existieren. Rechnerisch wurde der Test nach vorgegebenem Programm (30) auf der Rechenanlage des Statistischen Instituts (ISB) im Klinikum Großhadern vorgenommen.

Weitaus größere Bedeutung kam natürlich dem statistischen Nachweis eines vermuteten signifikanten Unterschieds zwischen Normalkollektiv und Diabetikergruppe zu. Auch hier wäre ein Wilcoxon-Test möglich gewesen, wenn lediglich die Unterschiede zwischen Normalkollektiv und Diabetikern in den einzelnen Zehnerdekaden getrennt von Interesse gewesen wären. Um beim Vergleich der beiden Mittelwerte auch die Streubreite der Meßwerte in den einzelnen Gruppen miteinzubeziehen, eignet sich am besten ein t-Test für unverbundene Stichproben (34).

Die Errechnung der Meßgröße erfolgt nach vorgegebenem Rechen-schema aus allen Meßwerten und ergibt einen t-Wert, der mit dem entsprechenden Vergleichswert einer F-Verteilungstabelle im Rahmen der student-Verteilung aufgelistet ist. Da im Falle eines signifikanten Unterschiedes die Diabetikergruppe einen höheren Mittelwert aufweisen würde als das Normalkollektiv, konnte der Test auf einseitige Prüfung beschränkt werden. Eine zweiseitige Prüfung unter Einschluß der Gleichheit der Mittelwerte hätte keinen größeren Rechenaufwand erfordert, die Präzision aber auf die Hälfte herabgesetzt. Um die größtmögliche Aussagekraft zu gewinnen, wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit mit dem kleinstmöglichen Wert bei einem t-Test, nämlich auf 0,01 veranschlagt, d.h. auf 1 % festgelegt. Dies ist gleichzeitig auch der niedrigste in einer F-Verteilungstabelle aufgelistete Wert (47). Grundvoraussetzung für einen t-Test für unverbundene Stichproben sind zwei Patientenkollektive, die jeweils normal verteilt sein müssen. Kollektive, die nicht einer Normalverteilung unterliegen, mindern die Aussagekraft eines statistischen Testes wie des t-Testes beträchtlich. Bei Vorliegen einer Normalverteilung müssen die Kollektive folgende zwei Voraussetzungen erfüllen:

Der Quotient aus Median und Mittelwert muß im Bereich zwischen 0,9 und 1,1 liegen. Außerdem darf die Standardabweichung nicht größer sein als ein Drittel des Mittelwertes. Sind diese Bedingungen erfüllt, liegt eine Normalverteilung im Sinne einer Gauß'schen Glockenkurve vor (30). Tab. 6 zeigt die entsprechenden Meßwerte.

Das Rechenprogramm eines t-Testes stellte für sich keine Probleme dar. Lediglich die Tatsache, daß ein Kollektiv von 169 Patienten gegen ein Kollektiv von 31 Patienten geprüft werden sollte, ergab das Problem, daß weder ein Programm für so große Stichprobenzahlen, noch eine F-student-Verteilung für so hohe Patientenzahlen auffindbar waren. Ersteres Problem ließ sich durch Umprogrammieren eines vorhandenen Programms und Erweiterung auf Patientenzahlen um 300 beheben. Der Prüf-t-Wert nach einer F-Verteilung für einen Test mit einseitiger Auslegung und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 konnte nach langer Suche in einer wissenschaftlichen Bibliothek aufgefunden und rechnerisch annähernd mittels eines Computers überprüft werden. Wie in Tab. 7 angegeben, liegt er bei 2,345. Im Verlaufe der statistischen Erhebung, deren wichtigste Werte in Tab. 7 aufgezeigt sind, ergab sich bei der vergleichenden Berechnung der Mittelwerte ein t-Wert von 17,11, der mathematisch ganz deutlich über dem Nachschlagewert von 2,345 liegt.

Mit diesem wichtigsten Ergebnis der vorliegenden Untersuchung läßt sich die statistische Aussage treffen, daß sich die Normalgruppe von den Diabetikern mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % signifikant unterscheidet. Damit ist auch mit mathematischen Methoden nachgewiesen, daß die Diabetiker im Durchschnitt eine höhere Inaktivierungsrate der Insulinase in menschlichen Erythrozyten haben als entsprechende Normalpersonen. Durch die Anwendung eines t-Testes für unverbundene Stichproben werden auch evtl. Unterschiede, bedingt durch ungleiche Patientenzahlen in den einzelnen Kollektiven, berücksichtigt.

3.5.5. Untersuchungen am Diabetikerkollektiv

Trifft man eine Unterteilung in bezug auf die Insulinabhängigkeit der diabetischen Stoffwechsellage, so ergeben sich Verhältnisse wie in Tab. 8 dargestellt. Bei den Insulin spritzenden Diabetikern

TAB. 8 Übersicht Diabetikerkollektiv

Insulintherapie, Typ I	n = 15	♀ = 6	♂ = 9
Übrige, Typ II	n = 17	♀ = 10	♂ = 7

Bei 15 Diabetikern vom Typ I unter Insulintherapie liegt der Mittelwert der Inaktivierung bei $\bar{X} = 99$

Bei allen anderen diabetikern mit nicht insulinpflichtigem Diabetes vom Typ II liegt der Mittelwert von 17 Patienten bei $\bar{X} = 116$

(klinisch Typ I) liegt die Enzyminaktivierungskapazität im Durchschnitt niedriger als im übrigen Kollektiv. In der restlichen Gruppe, den Diabetikern vom Typ II, die teilweise mit oralen Antidiabetika medikamentös therapierte Patienten und neu diagnostizierte nicht insulinpflichtige Fälle umfaßt, ergibt sich ein deutlich höherer Mittelwert. Man darf wohl davon ausgehen, daß die Höhe der Inaktivierungsrate nicht mit der Schwere der diabetischen Stoffwechsellage einhergeht, da normalerweise insulinpflichtige Diabetiker als schwerer erkrankt gelten als die übrigen Patienten. Bemerkenswert ist vielleicht die Tatsache, daß bei einer 65-jährigen Patientin, die einen gesicherten aber unbehandelten Diabetes seit zwei Jahren hatte, auch der höchste Enzymmeßwert, nämlich mit 168, gemessen wurde. Bei der Patientin handelt es sich um einen Zufallsbefund im Rahmen einer internistischen Untersuchung, Befunde wie folgt: Blutzucker nach Belastung 480 mg% bei einem Körpergewicht von 85 kg mit einer Körpergröße von 160 cm. Im allgemeinen zeigte sich auch, daß schlecht eingestellte Diabetiker oder unbehandelte diabetische Stoffwechsellagen verhältnismäßig öfter einen höheren Enzymmeßwert aufwiesen, als medikamentös richtig behandelte Patienten. Eine Abhängigkeit von Mahlzeiten oder Medikamentengabe erscheint nicht als wahrscheinlich, wenn auch nur bei einem Insulin spritzenden Diabetiker in regelmäßigen Abständen viermal am Tag untersucht wurde. Es ergab sich keine Abweichung der Enzymaktivität nach Mahlzeit bzw. Insulingabe.

Über das regulative Verhalten der Enzymaktivität kann auch noch festgestellt werden, daß sich die Aktivität wahrscheinlich nur über einen längeren Zeitraum hinweg verändert.

4. DISKUSSION

Als Ergebnis der oben durchgeführten Untersuchungen läßt sich festhalten, daß es sich bei dem Insulin inaktivierenden Enzymsystem in menschlichen Erythrozyten um eine Proteinase handelt, die optimal im physiologischen Bereich arbeitet. Auch nach Unterteilung des zur Untersuchung gelangten Normalkollektivs in einzelne Zehnerdekaden ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in bezug auf die Altersabhängigkeit der Inaktivierungskapazität feststellen.

Als wichtigstes Ergebnis dürfte der signifikante Unterschied der Inaktivierungsrate zwischen Normal- und Diabetikerkollektiv gelten. Die Gründe für diese Erhöhung der Enzymaktivität bei diabetischer Stoffwechsellage zu diskutieren, bereitet große Schwierigkeiten, da es sich um eine neue Beobachtung handelt, auf die bisher in keiner einschlägigen Literatur hingewiesen wurde. Es liegt auch noch keine weitergehende Untersuchung über das Verhalten der Insulinase in anderen Geweben bei diabetischer Stoffwechsellage vor. Eine endgültig befriedigende Erklärung für das festgestellte Phänomen kann jetzt noch nicht gegeben werden.

Kurzfristige Änderungen der Enzymaktivität sind nicht nachweisbar. Letztlich ergibt sich bloß ein Unterschied der Inaktivierungsrate beim Vergleich zwischen Normalkollektiv und ganz klar abgetrenntem Diabetikerkollektiv. Ließe man auch Grenzfälle bei nicht geklärter Stoffwechsellage zu, dürfte sich die scharf gezogene Grenze verwischen. Da bei diabetischer Stoffwechsellage normalerweise ein Insulinmangel vorliegt, wäre ohne jegliche Regulationsmöglichkeit nur eine damit korrespondierende verminderte Inaktivierungsrate erklärlich. Nun sind aber das im Blut zirkulierende Insulin und die abbauenden Enzyme innerhalb der Erythrozyten durch die Zellmembran voneinander getrennt, sodaß eine direkte Kontaktaufnahme nicht möglich ist. Erst durch die in der Einlei-

tung beschriebenen Mechanismen über Insulinrezeptoren und Möglichkeiten des Insulins in die Zelle einzudringen können Abbauvorgänge innerhalb der Erythrozyten in die Diskussion miteinbezogen werden. Da es abgesehen von seltenen traumatischen oder aggressiven Einwirkungen nicht zum plötzlichen Entstehen einer diabetischen Stoffwechsellage kommt, sondern die meisten Erkrankungen sich allmählich im Laufe der Zeit manifestieren, konnten auch in diese Untersuchung keine frisch entdeckten absolut neuen Diabetesfälle miteinbezogen werden. Bei den meisten Patienten bestand der Diabetes über längere Zeit hinweg. So sind die meisten hier aufgeführten insulintherapierten Diabetiker schon über längere Zeit in Behandlung, zum Teil schon über etliche Jahre hinweg, und damit treten bei ihnen behandlungsspezifisch relativ hohe Insulinspiegel nach Injektion auf. Inwieweit dieser immer wieder auftretende Hyperinsulinismus eine reaktive Vermehrung der Insulin abbauenden Kapazität bewirkt, ist noch ungeklärt. Auf jeden Fall dürfte nicht nur die reine Inaktivierungskapazität in den Erythrozyten, sondern auch die Regelung der Insulinaufnahme durch die Zellmembran, vermittelt durch entsprechende Rezeptoren, ausschlaggebend für die Abbaurate für Insulin in den Erythrozyten sein. Die umgekehrte Möglichkeit, nämlich eine Erhöhung der Insulininaktivierungsrate als Ursache für eine diabetische Stoffwechsellage, läßt sich diskutieren, ist jedoch wenig wahrscheinlich.

Die ursächliche Abklärung des Zusammenhangs zwischen Höhe der Enzymaktivität und der Ausprägung der diabetischen Stoffwechsellage bleibt das Ziel weiterer Forschungsarbeiten. Insbesondere die Einbeziehung der Forschungsergebnisse über Rezeptoren an der Zellmembran und Regulationsmechanismen der Insulinaufnahme könnten interessante Aspekte für die Gesamtregulation der insulinabbauenden Kapazität liefern. Hierbei wird auf lange Sicht die Interaktion zwischen Insulinspiegel und abbauenden Enzymsystemen durch gleichzeitige Messung beider Parameter von wissenschaftlichem Interesse sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bisher wurden zwei Wege der Insulininaktivierung in verschiedenen Geweben beschrieben, nämlich einmal die SH-Brückenspaltung mittels einer Glutathioninsulintranshydrogenase, zum anderen die Peptidkettenspaltung durch eine insulinspezifische Proteinase (Insulinase). Neben anderen Geweben findet sich diese Proteinase auch im Cytosolkompartiment menschlicher Erythrozyten. Der Zusatz von Heparin oder EDTA verändert die spezifischen Eigenschaften des Enzyms nicht. Längere Lagerung bei Zimmertemperatur oder mehrmaliges Einfrieren jedoch vermindern die Proteinaseaktivität. Durch Weiterentwicklung des von Kolb und Standl eingeführten Testes zur Inaktivierungsmessung mittels ^{125}I konnten Versuchsbedingungen zur Untersuchung eines Patientenkollektivs erarbeitet werden. Der optimale Arbeitsbereich liegt im physiologischen Milieu des menschlichen Körpers, d.h. bei einer Temperatur von 37°C und einem pH von 7,4. Auch die eingesetzten Insulinkonzentrationen liegen im natürlich vorkommenden Bereich. Der Einsatz von selektiven Hemmstoffen ermöglicht den Ausschluß von stimulierenden Agenzien, wie z.B. SH-Gruppen tragenden Verbindungen, wie Glutathion, die in Erythrozyten in millimolaren Konzentrationen vorliegen. Kurzfristige Änderungen der insulinabbauenden Aktivität treten nicht auf, des weiteren kann keine altersabhängige Veränderung des Inaktivierungspotentials festgestellt werden. Unterschiede zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht lassen sich nicht nachweisen. Im Durchschnitt deutlich höher liegende Werte finden sich bei Diabetikern. Gegenüber dem Normalkollektiv läßt sich ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen. Innerhalb des Diabetikerkollektivs lassen sich nochmals Differenzen zwischen insulinbehandelten Patienten und anderen Diabetikern aufzeigen. Bei einigen unbehandelten Diabetikern mit Altersdiabetes weist die Enzymaktivität weit über dem Durchschnitt liegende Werte auf.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Ansorge S. e.a.
Metabolism of Insulin and Glucagon
Eur. J. Bioch. Vol. 19 No. 2
- 2 Ansorge S., P. Bohley, H. Kirschke, J. Langner
 B. Wiederanders, H. Hanson
Metabolism of Insulin and Glucagon
Glutathione-Insulin Transhydrogenase from Microsomes
of Rat Liver
Eur. J. Biochem. 32 (1973) 27 - 35
- 3 Baskin F.K., A.E. Kitabchi
Substrate Studies for Insulin-Specific-Protease
Eur. J. Biochem. Vol. 37 No. 3
- 4 Berson S.A., R.S. Yalow
Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man
J. Clin. Invest. 39 (1960) 1157 -1175
- 5 Brush J.S.
Purification and Characterization of a Protease
with Specificity for Insulin from Rat Muscle
Diabetes Vol. 20 No.3
- 6 Carpentier J.L., P.Gordon, P. Freychet,
 A. Le Cam, L. Orci
Diabetologia 17 (1979) 379 - 384

- 7 Carroll A.M., K.D. Buchanan
 Physiological Factors Influencing Insulin Clearance
 by the Isolated Perfused Rat Liver
 Diabetologia 9 (1973) 174 -177
- 8 Cuatrecasas P.
 Interaction of Insulin with the Cell Membrane
 the Primary Action of Insulin
 Proc. Natl. Acad. Sc. 63 (1969) 450
- 9 Duckworth W.C., M.A. Heinemann, A.E. Kitabchi
 Purification of Insulin-Specific Protease by
 Affinity Chromatography
 Proc. Natl. Acad. Sc. USA Vol. 69 No. 12
- 10 Edgar P., D. Rabinowitz, T.J. Merimee
 Effects of Amino Acids on Insulin Release from
 Excised Rabbit Pancreas
 Endocrinology 84 (1969) 835
- 11 Floyd J.C., S.S. Fajans, J.W. Cam, R.F. Knopf, J. Rull
 Insulin Secretion in Response to Protein Ingestion
 J. Cl. Invest. 45 (1966) 1479
- 12 Förster H., H. Mehnert
 Kohlenhydratstoffwechsel
 in W. Siegenthaler: Pathophysiologie (42) Thieme 1976
- 13 Freychet P., R. Kahn, J. Roth, D.M. Neville
 Insulin Interactions with Liver Plasma Membranes
 J. Biol. Chem. 247 (1972) 3953

- 14 **Freychet P.**
Interactions of Polypeptide Hormones with Cell Membrane
Specific Receptors: Studies with Insulin and Glucagon
Diabetologia 12 (1976) 83 - 100
- 15 **Gambhir K.K., J.A. Archer, L. Carter**
Insulin Radioreceptor Assay for Human Erythrocytes
Cl. Chem. 23/9 (1977) 1590 - 1595
- 16 **Goldfine I.**
Does Insulin Need a Second Messenger
Diabetes 26 (1977) 148 -155
- 17 **Goldfine I.D., G.J. Smith**
Proc. Natl. Acad. Sc. USA 73 (1976) 1427 - 1431
- 18 **Grodsky G.M., P.H. Forsham**
An Immunochemical Assay of Total Extractable
Insulin in Man
J. cl. Invest. 39 (1960) 1070
- 19 **Grodsky G.M., L.L. Bennett, D. Smith, K. Nemecek**
The Effect of Tolbutamide and Glucose on the Timed Release
oof Insuline from the Isolated Perfused Pancreas
Reprint from Diabetes 15 (1966)
- 20 **Harper H.A., G. Löffler, P.E. Petrides, L. Weiss**
Physiologische Chemie
Springer 2.Auflage 1979
- 21 **Herold G.**
Scriptum Innere Medizin
AKU Fotodruck Köln 1980

- 22 **Howell S.L., K.W. Taylor**
Potassium Ions and Secretion of Insulin by Islets of
Langerhans Incubated in vitro
Biochem. J. 108 (1968) 17
- 23 **Immich H.**
Medizinische Statistik
Thieme Stuttgart 1974
- 24 **Keen H., R.J. Jarett, K.G.M.M. Alberti**
Diabetes mellitus: A new Look at Diagnostic Criteria
Diabetologia 16 (1979) 283
- 25 **Kolb H.J., E. Standl**
Purification to Homogeneity of an Insulin-Degrading
Enzyme from Human Erythrocytes
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 361 (1980) 1029-1039
- 26 **Kolb H.J., E. Standl**
An Insulin-Degrading Enzyme from Human Erythrocytes:
Isolation and Characterization
Reprint from: D. Brandenburg, A. Wollmer
Insulin Chemistry Structure and Function of Insulin
and Related Hormons
- 27 **Kolb H.J., E. Standl, H. Tschesche**
Diabetologia 10 (1974) 395 -396
- 28 **Lacy P.F.**
The Pancreatic Beta Cell
New Engl. J. Med. 276 (1967) 187

- 29 **Levine R., M.S. Goldstein, S.P. Klein, B. Huddlestun**
The action of Insulin on the Distribution of Galactose
in Eviscerated Nephrectomized Dogs
J. Biol. Chem. 179 (1949) 985
- 30 **Li C.C.**
Introduction to Experimental Statistics
Mc Graw New York 1964
- 31 **Löffler G., L. Weiss**
Die Stoffwechselwirkungen des Insulins
Handbuch der Inneren Medizin Bd. VII 2A
Springer 1975 249 - 303
- 32 **Mehnert H., K. Schöffling**
Diabetologie in Klinik und Praxis
Thieme 1974
- 33 **Mirsky I.A., R.H. Broh-Kahn**
The Inactivation of Insulin by Tissue Extracts
The Distribution and Properties of Insulin Inactivation
Extracts (Insulinase)
Arch. Biochem. 20 (1949) 1 - 9
- 34 **Mood A.M., F.A. Graybill**
Introduction to the Theory of Statistics
Springer New York 1963
- 35 **National Diabetes Data Group: Classification and Diagnosis
of Diabetes mellitus and other Categories of Glucose
Intolerance**
Diabetes 28 (1979) 1039

- 36 **Oldershausen von H.F.**
Diabetes mellitus
in R. Gross: Lehrbuch der Inneren Medizin
Schattauer-Verlag 1977
- 37 **Oyer P.E., S. Cho, J.D. Peterson, D.F. Steiner**
Studies on Human Proinsulin; Isolation and Amino Acid
Sequence of the Human Pancreatic C-Peptide
J. Biol. Chem. 246 (1971) 1375
- 38 **Petrides P., L. Weiss, G. Löffler, O.H. Wieland**
Diabetes mellitus
Urban & Schwarzenberg 4. Auflage 1981
- 39 **Posner B.I.**
Insulin Metabolizing Enzyme Activities in
Human Placental Tissue
Diabetes Vol. 22 No.7
- 40 **Rick N.**
Klinische Chemie und Mikroskopie
Springer 5. Auflage 1977
- 41 **Renold A.E.**
Insulin Biosynthesis and Secretion-
a still unsettled topic
New Engl. J. Med. 282/4 173 - 181
- 42 **Siegenthaler W.**
Klinische Pathophysiologie
Thieme 1976

- 43 **Statistisches Bundesamt**
Statistisches Jahrbuch für die BRD 1974
(Medizinisch-statistischer Auszug)
Kohlhammer 1974
- 44 **Tasaka Y., J. Campbell**
Pancreatic Insulinase and its Inhibition by the A and
B Chains and Partial Hydrolysate of Insulin
Canad. J. Biochem. Vol. 46
- 45 **Terris S., D.F. Steiner**
J. Cl. Invest. 57 (1976) 885 - 896
- 46 **Tschesche H., T. Dietl, H.J. Kolb, E. Standl**
An Insulin Degrading Proteinase from Human Erythrocytes
and its Inhibition by Proteinase Inhibitors
in: Proteinase Inhibitors 586 - 593
Springer 1974
- 47 **Überla K.**
Biomathematik
ISB Universität München
München-Großhadern 1976
- 48 **WHO Expert Committee on Diabetes mellitus**
Second Report
WHO Technical Report Series 646
Geneva 1980
- 49 **Wieland O., H. Mehnert**
Biochemie und Klinik des Insulinmangels
Thieme 1971

- 50 Wool I.G., R.E.H. Wettenhall, H. Klein-Bremhaar,
 N. Abayang
 Insulin and the Control of Protein Synthesis in Muscle
 The Translation of Polyuridylic Acid and
 Encephalomyocarditis Virus RNA by Normal and
 Diabetic Ribosomes
 in: Insulin Action I.B. Fritz
 Academic Press 415 New York 1972

Für die freundliche Unterstützung und fachkundige
Anleitung beim Erstellen dieser Arbeit darf ich
meinen herzlichsten Dank ausdrücken:

dem klin.-chem. Institut des Städt. Krks. Harlaching
Herrn Priv.-Doz. Dr. L. Weiss
für die Überlassung des Themas und die
persönliche Unterstützung insbesondere
Herrn Priv.-Doz. Dr. H.J. Kolb

Herrn Dr.med. L. Wanner
und Frau M. Hano
München

Lebenslauf

Am 13. März 1956 wurde ich als Sohn des Dipl. Ing. Hanns Schneider und seiner Ehefrau Anny, geb. Hinterberger, in München geboren. Von 1962 bis 1966 besuchte ich die Volksschule, von 1966 bis 1975 das humanistische Karlsgymnasium in München-Pasing und legte dort das Abitur ab.

Im Wintersemester 1975 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Studium der Human-Medizin. Im November 1981 legte ich den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab und erhielt die Approbation als Arzt.

Während der letzten zwei Jahre des Studiums war ich auch Mitarbeiter in einer Münchener internistischen Praxis mit Schwerpunkt auf Sonographieuntersuchungen, daneben Ergometrie und Röntgen.

Zur Zeit leiste ich meinen Grundwehrdienst ab und zwar als Stabsarzt in Landsberg.

